

Aus dem
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät Universität München
Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. O.-R. Kaaden

und dem
Bayerischen Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
- LGL -

Prävalenz von Leptospirenantikörpern in bayerischen Rinderherden und von Leptospiren bei abortierten Rinderfeten.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Martin Alfons Schmid
aus
Regensburg

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwigs-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. O.-R. Kaaden
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. H. Ammer

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Morphologie und Wachstumseigenschaften von Leptospiren	2
2.2	Systematik	4
2.3	Epidemiologie der Leptospirose beim Rind	6
2.3.1	Natürliche Reservoirs für Leptospiren	6
2.3.2	Übertragung von Leptospiren	8
2.3.3	Pathogenese	9
2.3.4	Verlauf und Persistenz von Antikörper-Titern	11
2.4	Labordiagnostik der Rinderleptospirose	14
2.4.1	Direkte Nachweismethoden	14
2.4.1.1	Mikroskopischer Nachweis	14
2.4.1.2	Immunfluoreszenztest	15
2.4.1.3	Kulturelle Isolierung	16
2.4.1.4	Tierexperimenteller Nachweis	16
2.4.1.5	<i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)	17
2.4.2	Indirekte Nachweismethoden	19
2.4.2.1	Mikroagglutinationsreaktion (MAR)	19
2.4.2.2	Objekträgeragglutinations-Schnelltest	21
2.4.2.3	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	22
2.4.2.4	Komplementbindungsreaktion (KBR)	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Probenanzahl und Auswahl zur Untersuchung der Prävalenz von Leptospiren-Antikörpern	23
3.1.1	Stichprobenumfang für die Prävalenzermittlung	24
3.1.2	Auswahl der Betriebe und der Tiere, Erhebung von epidemiologisch relevanten Daten in den Betrieben	25
3.2	Proben zum Nachweis von Leptospiren in abortierten Rinderfeten und Serumproben zur Bestandsdiagnostik	30
3.2.1	Fetaler Labmageninhalt für den Leptospiren-Nachweis	30
3.2.2	Beschaffung von Serumproben aus dem Bestand der untersuchten Feten	31
3.3	Die Mikroagglutinationsreaktion	32
3.3.1	Verwendete Antigene	32
3.3.2	Kultivierung der Leptospiren	33
3.3.3	Durchführung der Mikroagglutination	35

3.4	<i>Leptospira</i>-spezifische PCR (polymerase chain reaction)	38
3.4.1	Vergleich zweier Methoden zur Ermittlung der optimalen DNS-Extraktion sowie Überprüfung der Nachweisgrenze der PCR im Probenmaterial	38
3.4.2	Extraktion der Leptospiren-DNA aus Labmageninhalt	39
3.4.3	Durchführung der PCR	40
3.5	Kulturelle Isolierung der Leptospiren aus PCR-positiven Labmagenproben	43
3.6	Statistische Auswertung der Fragebögen	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Durchführung der Beprobung	45
4.2	Serologische Ergebnisse	45
4.2.1	Häufigkeit der einzelnen Serovare, bezogen auf Rinder und Herden	45
4.2.2	Regionale Verteilung der Reagenten in Bayern	51
4.2.3	Prävalenz von Herden mit Reagenten	54
4.2.4	Datenanalysen anhand des Fragebogens in Bezug auf serologisch positive Betriebe	54
4.3	Ergebnisse von Leptospiren-Nachweisen in Feten und der korrespondierenden Serologie in dem Betrieb	60
4.3.1	Ergebnisse zur Sensitivität der Leptospiren-PCR und Vergleich von Extraktionsmethoden	60
4.3.2	Ergebnisse der Leptospiren-PCR-Untersuchungen aus Feten	63
4.3.3	Antikörpernachweis im Herzblut der abortierten Feten	66
4.3.4	Antikörpernachweis in Proben der Herden mit <i>Leptospira</i> -PCR-untersuchten Feten	66
5	Besprechung der Ergebnisse	69
6	Zusammenfassung	78
7	Summary	79
8	Literaturverzeichnis	80

Abkürzungsverzeichnis

- µl	Mikroliter
- A. bidest.	Aqua bidestillata
- A. dest.	Aqua destillata
- B ₁	Thiamin
- B ₁₂	Cobalamin
- Bratis.	Bratislava
- BSA	Bovines Serum Albumin
- bzw.	beziehungsweise
- C _t	<i>Threshold Cycle</i>
- d	Tag
- DNS	Desoxyribonukleinsäure
- EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
- ELISA	<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
- EMJH	<i>Ellinghouse-McCullough-Johnson-Harris</i>
- et al.	et altera
- g	Gramm
- Grippot.	Grippotyphosa
- Hi-Tier	Herkunftssicherungs- und Informationssystem für Tiere
- Icteroha.	Icterohaemorrhagiae
- IgG	Immunglobulin G
- IgM	Immunglobulin M
- KBR	Komplementbindungsreaktion
- L.	<i>Leptospira</i>
- MAR	Mikroagglutinationsreaktion
- min	Minuten
- ml	Milliliter
- p. inf.	post infectionem
- PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
- PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
- RNS	Ribonukleinsäure
- s	Sekunde
- spp.	Spezies (Plural)
- v. a.	vor allem
- z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Die Leptospirose, verursacht durch *Leptospira spp.*, ist eine weltweit vorkommende Infektionskrankheit und betrifft neben dem Rind viele andere Spezies. Dabei treten Krankheitsbilder in verschiedenen Formen auf. Zumeist verläuft die Leptospireninfektion beim Rind klinisch inapparent. Sie äußert sich meist erst im chronischen Stadium durch Störungen in der Reproduktion. Akute Erkrankungen sind beim Rind selten und betreffen meist Jungtiere. Der ökonomisch größte Schaden wird durch die gehäuft auftretenden Aborte verursacht. Abhängig von der Region variiert dabei das Schadensausmaß stark und wird maßgeblich durch den Verbreitungsgrad der Leptospirose und deren klinische Ausprägung bestimmt. Einzelne Autoren sehen für Aborte beim Rind die Leptospiren mit bis zu 40 % als Ursache. Bei Infektionen mit Serovar hardjo sind 60 % und mehr der Rinder im Bestand serologisch positiv. Die Ergebnisse dieser Studien sind spezifisch für die einzelnen Regionen und hängen von den regionalen Umständen der Rinderhaltung ab.

Störungen des Reproduktionsgeschehens, insbesondere Aborte, führen insgesamt zu beachtlichen wirtschaftlichen Verlusten in der Rinderhaltung. Bevor gezielte Maßnahmen wie z. B. Schutzimpfungen oder spezielle Hygieneprogramme gegen infektiöse Ursachen initiiert werden, ist die Relevanz der jeweiligen Infektion abzuklären. Für die Region Bayern ist die Relevanz der Leptospirose beim Rind bislang nicht geklärt. In der vorliegenden Arbeit wird die Herdenprävalenz sowie die Prävalenz bei Abortfällen bestimmt, um die Bedeutung der Leptospirose für Bayern zu ermitteln. Für die Untersuchung der Herdenprävalenz wurde eine randomisierte Auswahl von 1213 Betrieben herangezogen. Jeweils drei Serumproben von Jungtieren wurden auf Antikörper gegen Leptospiren untersucht. Die Häufigkeit von Leptospiren bei abortierten Rinderfeten wurde mithilfe einer *real time* PCR ermittelt.

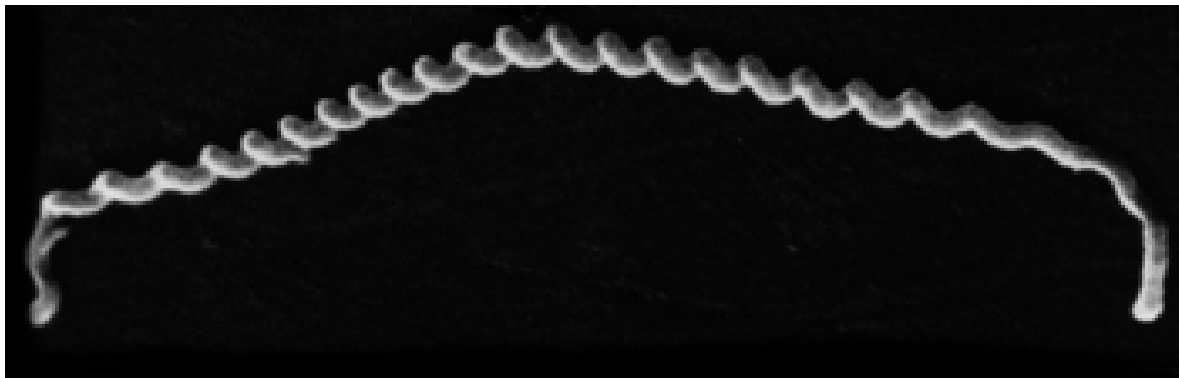
2 Literaturübersicht

2.1 Morphologie und Wachstumseigenschaften von Leptospiren

Leptospiren sind länglich ($0,1\ \mu\text{m} \times 6\text{-}20\ \mu\text{m}$) und besitzen eine dünne, schraubenförmig gewundene Struktur. Sie bestehen aus einem Protoplasmazyylinder, zwei periplasmatischen Flagellen und einer mehrschichtigen äußeren Hülle. Ein oder beide Enden der Leptospiren sind frei gebogen, wodurch eine Form zustande kommt, die an Kleiderbügel erinnert. Eine spezifische Diagnose ist jedoch aufgrund der Morphologie alleine nicht möglich. Die starke Beweglichkeit der Leptospiren basiert auf einer rotierenden Bewegung um die eigene Achse und auf einer Krümmung des Bakteriums, ausgehend von den beiden Flagellen. Die Lipopolysaccharide der Zytoplasmamembran sind in ihrer Zusammensetzung anderen gramnegativen Bakterien ähnlich. Die Endotoxinaktivität der Leptospiren ist vergleichsweise gering.

Leptospiren lassen sich mit Anilinfarbstoffen kaum anfärben, daher wird die Gramfärbung selten angewendet. Mit der Methode nach Giemsa lassen sich Leptospiren gut anfärben. Bei fixiertem Gewebe ist die Silberimprägnation am besten geeignet. Nativ erscheinen Leptospiren im Phasenkontrast- und Dunkelfeldmikroskop aufgrund ihrer Struktur und Beweglichkeit typisch (FAINE 1982; LEVETT 2001).

Abbildung 1: *Leptospira interrogans* abgebildet im Rasterelektronenmikroskop:
(YELTON 2004)



Leptospiren sind obligat aerob mit einem Wachstumsoptimum bei 28-30 °C. Ein Wachstum ist zwischen 13 °C und 40 °C möglich. Der optimale pH-Wert liegt zwischen 7 und 12. Die Vermehrung erfolgt durch Zweiteilung bei einer Generationszeit von sieben bis zwölf Stunden. Dabei benötigen sie als organische Supplemente Vitamin B₁ und B₁₂ und langkettige Fettsäuren (ab C₁₄). Leptospiren können ihre Energie und ihren Kohlenstoffbedarf nur aus Fettsäuren und Alkoholen beziehen. Außerdem benötigen sie die Fettsäuren als Substrat für den Aufbau der Zytoplasmamembran, da langkettige Fettsäuren selbst nicht neu synthetisiert werden können. Als Stickstoffquelle benötigen Leptospiren Ammonium-Salze. Pyruvate sind zwar nicht essenziell für das Wachstum, beschleunigen dieses jedoch bei einigen Serovaren z. B. Serovar hardjo. Wegen des langsamen Wachstums ist die Gefahr der Überwucherung durch andere Keime groß, sodass den Nährmedien Hemmstoffe zur Unterdrückung der Begleitflora zugesetzt werden müssen. Es bieten sich dafür 5-Fluorouracil, Nalidixinsäure u. a. an (FAINE 1982; SELBITZ 1992).

Für die Suspensionskultur zur Stammhaltung und für Isolate werden verschiedene Medien (Fletcher, Stuart, Korthof) verwendet. Am gebräuchlichsten ist das synthetische Medium nach Ellinghouse-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), dem als *Enrichment* u. a. bovinen Albumin und Tween 80 zugesetzt wird. Zur Primärisolation werden vor allem halbfeste Nährmedien verwendet, die man durch Zusatz von 0,2 % Agar aus flüssigen Medien (z. B. EMJH) herstellt. Dabei wachsen primäre Isolate langsam und benötigen für den Nachweis im Dunkelfeldmikroskop bis zu 13 Wochen. Subkulturen wachsen hingegen schneller und benötigen meist nur 10 bis 14 Tage. Die Kulturen sollten einmal in der Woche im Dunkelfeldmikroskop kontrolliert werden, ob Leptospirenwachstum sichtbar und ob die Kultur mit Begleitkeimen kontaminiert ist. (FAINE 1982; LEVETT 2001; ROLLE u. MAYR 2002)

2.2 Systematik

Das Genus *Leptospira* gehört gemeinsam mit dem Genus *Leptonema* zur Familie der *Leptospiraceae* in der Ordnung Spirochaetales zur Klasse der Spirochaetes (TAXONOMY BROWSER 2004). Die bis 1989 geltende Einteilung unterschied die alle pathogenen Leptospiren zusammenfassende Spezies *Leptospira interrogans* von den saprophytär lebenden Leptospiren der Spezies *Leptospira biflexa*. Beide Spezies werden aufgrund ihrer antigenetischen Eigenschaften in zahlreiche Serovare eingeteilt, wobei *L. interrogans* über 200 Serovare beinhaltet, *L. biflexa* über 60 Serovare (LEVETT 2001).

Die phänotypische Einteilung der Leptospiren wurde zugunsten einer genotypischen Einteilung aufgegeben. Durch Hybridisierung der DNS von verschiedenen Leptospirenstämmen können diese zu verschiedenen Genospezies zusammengefasst werden (BRENNER et al. 1999; RAMADASS et al. 1990; RAMADASS et al. 1992). So wurde nach der neuen Taxonomie das Genus *Leptospira* in 16 Genospezies eingeteilt und das neue Genus *Leptonema* definiert (siehe Tabelle 1) (BRENNER et al. 1999). Am häufigsten nutzt man für die genetischen Verwandtschaftsstudien die Sequenz des Gens, das die 16S ribosomale RNS (rRNS) codiert. Die DNS-Hybridisierung ist zwar die Referenzmethode, um verschiedene Gruppen von Leptospiren zu Spezies zusammenzufassen, hat jedoch den Nachteil, dass sie zu aufwändig für Routineuntersuchungen ist. DNS-Fingerprinting mittels Puls-Feld-Gel-Elektrophorese ist dagegen einfacher durchzuführen (ELLIS et al. 1991; HERRMANN et al. 1992; TERPSTRA 2003). Die Genotypisierung der Leptospiren behält die vormalige Einteilung in saprophytär lebende und pathogene Spezies nicht grundsätzlich bei und geht auch nicht mit der Einteilung der Serovare einher (FAINE 1994). So ist zum Beispiel mit Fingerprinting von rRNS bewiesen worden, dass das Serovar hardjo in die Subtypen hardjobovis (Spezies *L. borgpetersenii*) und hardjoprajitno (Spezies *L. interrogans*) unterteilt werden kann (PEROLAT et al. 1994).

Die bewährte Einteilung der Leptospiren in Serovare hat jedoch nach wie vor ihre Bedeutung. Der charakteristische klinische Verlauf von Leptospirosen, der Bezug zu bestimmten Hauptwirten und die Ausbildung einer Immunität gegen Leptospiren sind serovarspezifisch. Bis zur Entwicklung von molekularen Untersuchungsmethoden, die einfach und validiert sind, werden Kliniker und Epidemiologen die ursprüngliche Einteilung in Serovare weiterhin verwenden (FAINE 1994; LEVETT 2001).

Tabelle 1: Auflistung der Genospezies und Serogruppen nach BRENNER et al. (1999)
überarbeitet durch TERPSTRA (2003)

Spezies	Serogruppen
<i>L. alexanderi</i>	Hebdomadis, Manhao
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum, Javanica, Sejroe, Tarassovi
<i>L. interrogans</i> sensu stricto	Australis, Autumnalis, Canicola, Sejroe Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes,
<i>L. kirschneri</i>	Autumnalis, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae
<i>L. noguchi</i>	Australis, Icterohaemorrhagiae
<i>L. santarosai</i>	Hebdomadis, Mini, Pyrogenes, Sejroe, Tarassovi
<i>L. weilii</i>	Celledoni, Javanica, Tarassovi
<i>L. faine</i> ^a	Hurstbridge
<i>L. inada</i> ^a	Lyme, Manhao
<i>L. meyer</i> ^a	Javanica, Mini, Sejroe
<i>L. biflexa</i> sensu stricto ^b	Andamana
<i>L. wolbachii</i>	Codice, Semarang
<i>Turneria parva</i>	Tureneri
<i>Leptonema illini</i> ^b	“Leptonema”
Genomospecies 1 ^a	Saprophytäre Serogruppe Ranarum
Genomospecies 3	Vorläufig saprophytäre Serogruppe Holland
Genomospecies 4 ^b	Icterohaemorrhagiae
Genomospecies 5 ^b	Saprophytäre Serogruppe Ranarum

^a Pathogenität nicht geklärt

^b Saprophyten/andere Genera

2.3 Epidemiologie der Leptospirose beim Rind

2.3.1 Natürliche Reservoirs für Leptospiren

Prinzipiell kann jeder Säuger von jedem Leptospiren-Serovar infiziert werden. Jedoch sind die relevanten Serovare nur in bestimmten Regionen endemisch. Aufgrund der Adaptation einzelner Serovare werden Tierarten in Hauptwirte und Nebenwirte unterteilt. Die Verbreitung der Leptospirenserovare wird durch chronische Infektionen der Nierentubuli von Hauptwirten getragen. Hauptwirte sind gegenüber spezifischen Leptospireninfektionen hoch empfänglich. Dies begünstigt die Übertragung innerhalb der Art, daher ist die Gefahr einer Endemie für die Hauptwirtpopulation relativ hoch. Die Tiere infizieren sich dabei meist im jungen Alter und eine Infektion verläuft häufig subklinisch oder mit milden Symptomen. Die Erregerausscheidung mit dem Urin kann bei chronisch infizierten Tieren mit dem Alter zunehmen. Die Inzidenz variiert in Abhängigkeit von den Faktoren Populationsdichte, Altersstruktur, Kontaktsituation, Klima und Witterung. Die Empfänglichkeit von Nebenwirten bei Leptospireninfektionen ist dagegen gering. Manifestiert sich eine Infektion dennoch, so durchlaufen Nebenwirte eine teilweise schwerere klinische Erkrankung mit möglicherweise letalem Ausgang. Die Infektion der Nierentubuli und damit die Ausscheidung der Leptospiren mit dem Harn ist dabei von kurzer Dauer. Nebenwirte infizieren sich hauptsächlich durch indirekten Kontakt zu infiziertem Harn von Hauptwirten. Eine Tierart kann in Abhängigkeit vom jeweiligen Serovar sowohl Hauptwirt als auch Nebenwirt sein. Als Reservoir kommt die größte Bedeutung den Nagern zu. Ratten sind Hauptwirte für Erreger der Serogruppe Icterohaemorrhagiae und Ballum, Mäuse für die Serogruppe Ballum und Grippotyphosa (KUIKEN et al. 1991; LEVETT 2001; LITTLE 1986; THIERMANN 1984; TURNER 1967).

Beim Rind sind verschiedene Serovare nachgewiesen worden. Die bedeutendsten sind hardjo, pomona und grippotyphosa. Daneben kommen ebenfalls Infektionen mit icterohaemorrhagiae, canicola, bratislava, Hebdomadis, Tarassovi, Bataviae, Autumnalis, Australis und Sejroe vor (FAINE 1994).

Für Serovar hardjo ist das Rind Hauptwirt. Dies ist weltweit in allen Ländern, die approbata Untersuchungen durchgeführt haben, mit entsprechender Isolattypisierung und hoher Prävalenz bestätigt worden. Durch molekularbiologische Untersuchungen können zwei Genotypen, hardjobovis und hardjoprajitno, bei Rind und Schaf unterschieden werden. hardjobovis, das dem Rind besser angepasst ist, wurde in den meisten Ländern gefunden und wird in größeren Mengen mit dem Rinderharn ausgeschieden. hardjoprajitno wurde

demgegenüber bis jetzt nur in einigen Ländern, vor allem in Europa, nachgewiesen (ELLIS et al. 1981; ELLIS 1994; ROLLE u. MAYR 2002).

Serovar pomona ist die wichtigste Ursache für Nebenwirt-Infektionen mit Leptospiren beim Rind in Nordamerika, Australien und Neuseeland. Als Hauptwirte dienen für Serovar pomona wildlebende Tiere und das Schwein. In Teilen von Afrika, Russland und Israel ist das Rind ebenfalls ein wichtiger Nebenwirt für Infektionen mit Serovar grippotyphosa, dessen Hauptwirte vor allem Wühlmäuse sind. Des Weiteren sind Serovar Autumnalis für Gebiete in der Karibik, einige Serovare der Serogruppe Pyrogenes für Teile von Afrika und Serovar Zannoni für Queensland als relevant beschrieben, bei denen das Rind als Nebenwirt angegeben wird (ELLIS 1994; FAINE 1994; KUIKEN et al. 1991).

2.3.2 Übertragung von Leptospiren

Leptospiren werden mit einer Konzentration von über 10^5 Erreger pro Milliliter Urin während der ersten Wochen nach der Infektion ausgeschieden. Für die Infektion eines empfänglichen Tieres werden nur wenige Leptospiren benötigt (HEATH u. JOHNSON 1994). Unter natürlichen Verhältnissen sind die Schleimhäute des Kopfes und die verletzte äußere Haut die Haupteintrittspforten (HANSON 1982). Während einer Mastitis werden Leptospiren mit der Milch ausgeschieden (ELLIS et al. 1976).

Die direkte Übertragung (von Tier zu Tier) hat bei Infektionen mit Serovar hardjo für das Rind die größte Bedeutung. Als Übertragungswege sind direkte Kontakte mit Urin, Vaginalausfluss nach Geburt bzw. Abort (ELLIS et al. 1985) und infizierter Plazenta aber auch die venerische Übertragung (ELLIS et al. 1986) und die diaplazentare Übertragung bekannt. Diese Form der Infektion ist daher unabhängig von Einflüssen, wie Kontakt zu Nagetieren, Umgebung der Tiere oder Klima. Die Erregerausscheidung mit dem Urin ist am größten zwischen der vierten und sechsten Woche post infectionem. Danach lässt die Intensität der Leptospirurie nach und die Ausscheidung erfolgt intermittierend mit einer Dauer von bis zu zwölf Monaten, manchmal sogar mit lebenslänglicher Persistenz (HATHAWAY u. LITTLE 1983). Oft ist dabei der Verlauf subklinisch. Spezifische Antikörper sind unter Umständen nicht nachzuweisen. Diese Aspekte führen zum endemischen Charakter der Hardjo-Infektion beim Rind (ELLIS et al. 1981; ELLIS 1994).

Für die Infektion von Nebenwirten mit Leptospiren spielt vor allem die indirekte Übertragung eine Rolle. Die Prävalenz von Leptospireninfektionen nicht rinderadaptierter Serotypen ist abhängig von Umwelteinflüssen, die stabilisierend auf Leptospiren wirken (z. B. Feuchtmilieu) und von der Durchseuchung und Präsenz der Hauptwirte (ELLIS 1994; THIERMANN 1984). Eine Korrelation von nicht-wirtsadaptierten Serovaren im Rind mit der Nagerpopulation ist nachgewiesen (HEATH u. JOHNSON 1994). Optimal für Leptospiren ist eine warme und feuchte Umgebung mit neutralem oder leicht alkalischem Milieu. Leptospiren können innerhalb eines pH-Bereichs von 5-6,2 und in kaltem, nicht gefrorenem Wasser bis zu drei Wochen überleben (SMITH u. SELF 1955; THIERMANN 1984). Einen Anstieg von vornehmlich indirekten Infektionen kann man auch bei lang anhaltenden Regenperioden und in Feuchtgebieten beobachten (HEATH u. JOHNSON 1994).

2.3.3 Pathogenese

Leptospiren sind infektiös und vermögen durch intakte Schleimhaut einzudringen (HEATH u. JOHNSON 1994). Empfängliche Tiere infizieren sich meist durch das Eindringen der Leptospiren in die Schleimhäute der Augen, des Maules, der Nase, der Vagina und des Penis. Auch durch das Eindringen in die verletzte oder von Wasser aufgeweichte äußere Haut ist eine Infektion möglich. Nach einer Inkubationszeit von vier bis zehn Tagen folgt eine Bakteriämie, die von wenigen Stunden bis zu sieben Tagen dauern kann. Während dieser Zeit verläuft die Infektion meist subklinisch. Schwere klinische Erscheinungen sind eher selten und gehen mit Pyrexie und Leptospirenausscheidung mit der Milch einher. Am häufigsten kommen klinisch manifeste Erkrankungen bei jungen Tieren vor, die mit bestimmten Serovaren (icterohaemorrhagiae, grippotyphosa) infiziert sind. Dabei können Hämoglobinurie, Ikterus, Fieber, Anämie und Dyspnoe durch Lungenstau vorkommen. Dies wird durch eine funktionelle Zerstörung von inneren Organen verursacht, manchmal kommt es zusätzlich zu einer Meningitis. Eine hämolytische Anämie, verursacht durch Produktion von Hämolsinen, aber auch die ischämische und toxische Schädigung von Hepatozyten bedingen den Ikterus. Später kann es zu einer intravaskulären hämolytischen Anämie kommen, die durch auf Erythrozyten anheftende Leptospirenantigene mit anschließender Antikörperreaktion verursacht wird. Während dieser Zeit können Leptospiren aus Blut, Zerebrospinalflüssigkeit und den meisten Organen isoliert werden.

(ELLIS 1994; PRESCOTT 1992)

Mit dem Erscheinen von zirkulierenden Antikörpern ist die Phase der ersten Bakteriämie beendet. Gewöhnlich gelingt der erste Antikörpernachweis ab dem zehnten Tag nach der Infektion. Die initiale Antwort ist IgM-vermittelt und kann das Wachstum der Leptospiren zwar verzögern, diese aber nicht zerstören. Erst die spätere IgG-Antwort ist für die Lysis der Leptospiren verantwortlich (HEATH u. JOHNSON 1994). Opsonisierende Antikörper vermitteln die Beseitigung von Leptospiren. In jenen Organteilen, die von IgG-Immunglobulinen kaum oder nicht erreicht werden, persistieren Leptospiren. Dies ist der Fall in den proximalen Tubuli renales und im Genitaltrakt. Eine mögliche zweite Pyrexie wird durch eine weitere Bakteriämie, eventuell auch durch Toxine, ausgelöst. Beide gehen von persistierenden Leptospiren-Foci aus.

Die Schädigung der Niere beruht auf einer interstitiellen Nephritis und einer transienten Tubulusdegeneration und kann unbedeutend, chronisch, aber auch letal verlaufen. Bei adulten Rindern verläuft die Infektion gewöhnlich subakut mit einer Pyrexie, Agalaktie und Mastitis.

Ellis (1994) konnte Leptospiren noch am Tag 142 post infectionem im Uterus von Rindern nachweisen. Die Infektion kann eine Plazentitis auslösen und auf den Fetus übergehen. Die Konsequenz sind Aborte, Totgeburten und die Geburten von lebensschwachen Kälbern. Diese Schäden in der Reproduktion können zwar von allen pathogenen Leptospiren verursacht werden, jedoch sind hauptsächlich die Serovare pomona und hardjo verantwortlich. Der in Europa vorherrschende Subtyp hardjoprajitno soll virulenter sein und mehr Aborte verursachen als der Subtyp hardjobovis. Bei Serovar pomona tritt das Verwerfen gewöhnlich ein bis sechs Wochen nach der akuten Infektion auf, bei Serovar hardjo nach vier bis zwölf Wochen. Meistens sind die Tiere während der akuten Phase der Infektion klinisch unauffällig. Das zeitliche Auftreten der Aborte und der anderen Auswirkungen ist unterschiedlich. Hardjo-Infektionen treten vom vierten Monat bis zum Ende der Trächtigkeit auf und verursachen wahrscheinlich auch einen embryonalen Fröhtod. Pomona-Infektionen treten gewöhnlich während den letzten drei Monaten der Trächtigkeit auf, Autumnalis-Infektionen dagegen im zweiten Trimester (ELLIS 1994; PRESCOTT 1992).

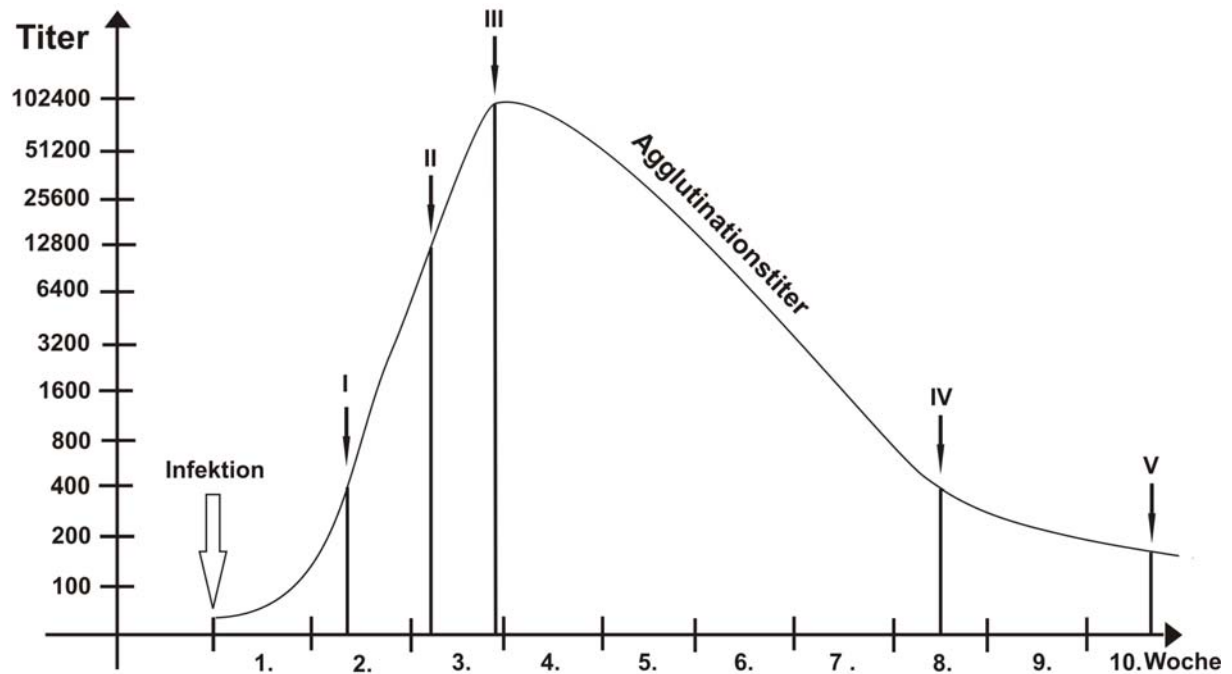
2.3.4 Verlauf und Persistenz von Antikörper-Titern

Nach der Erstinfektion beginnt ab dem dritten bis zum zehnten Tag ein nachweisbarer leptospirenspezifischer IgM-Antikörperanstieg. Diese frühe Reaktion ist weniger serovarspezifisch, da sie mit nichtserovarspezifischem Antigen der äußeren Spirochaetenhülle ebenso reagiert als mit serovarspezifischem Antigen. Bei den so genannten paradoxen Reaktionen gibt es mehrere frühe Reaktionen gegen verschiedene Serovare. Das Serovar, das den höchsten Antikörpertiter hervorruft, ist bei paradoxen Reaktionen jedoch nicht für die Infektion verantwortlich. Der Höhepunkt des IgM-Titerverlaufs wird nach zwei bis drei Wochen p. inf. erreicht. Die IgG-Antwort ist viel langsamer und erreicht die höchsten Titer zwischen der 12. und 30. Woche nach der Infektion. Diese später entstandenen Titer sind jedoch mehr serovarspezifisch (ELLIS 1994; FAINE 1994; GODDARD et al. 1991; HEATH u. JOHNSON 1994; LEVETT 2001).

Bei einem Infektionsversuch infizierte Thiermann sechs trächtige Kühe mit Serovar hardjo. Die ersten agglutinierenden Antikörper konnten am vierten Tag post infectionem nachgewiesen werden. Die höchsten Titer wurden zwischen dem 11. und 20. Tag erreicht, das Maximum war bei einer Verdünnung von 1:81920 (THIERMANN 1982).

Zur Interpretation von Titern agglutinierender Antikörper geben KATHE u. MOCHMANN (1967) ein Standardschema an (siehe Abbildung 2). Diese wird jedoch von späteren Untersuchungen relativiert.

Abbildung 2: Schematische Darstellung des Titerverlaufes bei der Leptospirose und Bewertung serologischer Befunde, modifiziert nach KATHE u. MOCHMANN (1967)



- I. und II. Blutentnahme: Agglutinationstiter = gleich hohe Titer - kein diagnostischer Anhalt für eine aktuelle Leptospirose
- I., II. und III. Blutentnahme: Agglutinationstiter - Titeranstieg = aktuelle Leptospirose
- IV. und V. Blutentnahme: Agglutinationstiter - Titerwert gleichbleibend bzw. abfallend = chronische bzw. Überstandene Leptospirose

Die Höhe der Antikörpertiter und deren Persistenz variieren stark. Es besteht eine Abhängigkeit von der Tierart, dem Serovar und der Art der Infektion. Die breite Varianz bei der Persistenz von Antikörpern zeigen folgende zwei Berichte von Hardjo-Infektionen. DURFEE u. ALLEN (1980) haben bei 59 Kühen, die sich bereits natürlich infiziert hatten, über 63 Wochen hinweg den Titerverlauf verfolgt. Dabei hatten 14 von 59 Kühen (23,7 %) sowohl bei der ersten als auch bei der letzten Untersuchung Titer über 1:100. Ellis hingegen untersuchte Serum von Kühen, die gerade abortiert hatten und bei deren Feten Serovar hardjo isoliert werden konnte. Bei acht von 35 Kühen (22,9 %) konnten keine Antikörper nachgewiesen werden ($\leq 1:10$, MAR). Es wird davon ausgegangen, dass die Titer innerhalb des Zeitraumes zwischen der Infektion und dem Abort soweit fallen, dass sie nicht mehr nachzuweisen sind (ELLIS et al. 1982). Ähnliches wurde auch bei einer experimentellen Infektion mit Serovar hardjo nachgewiesen (ELLIS u. MICHNA 1977). Bei infizierten Menschen wird von einer nachweisbaren Antikörperpersistenz über fünf Jahre hinweg berichtet (LUPIDI et al. 1991).

Die Persistenz von maternalen Antikörpern in Kälbern wird mit bis zu 13 Wochen angegeben (PALIT et al. 1991).

2.4 Labordiagnostik der Rinderleptospirose

Klinische Symptome der Leptospirose sind nicht pathognomonisch, auch variiert das klinische Bild stark. Zusätzlich zu Anamnese, Klinik und Pathologie ist für eine ätiologische Diagnose die mikrobiologische Untersuchung unerlässlich (FAINE 1982).

Die zahlreichen Möglichkeiten in der Labordiagnostik unterscheidet man grundsätzlich in Methoden, mit denen man Leptospiren oder Teile davon direkt nachweist oder indirekte Methoden zum Nachweis von Antikörpern gegen Leptospiren.

2.4.1 Direkte Nachweismethoden

2.4.1.1 Mikroskopischer Nachweis

Die direkte mikroskopische Untersuchung ist aufgrund der zarten Struktur von nativen Leptospiren nur bedingt aussagekräftig. Für die Betrachtung im Hellfeldmikroskop oder im Phasenkontrastmikroskop müssen die Leptospiren vorher fixiert und gefärbt werden. Die Methode der Wahl ist die Lebenddarstellung im Dunkelfeldmikroskop (KATHE u. MOCHMANN 1967). Eine Darstellung von Leptospiren im Dunkelfeldmikroskop ist in flüssigen Kulturmedien wie in Blut und Urin möglich. Diese Nachweismethode ist wenig sensitiv und man benötigt mindestens eine Konzentration von 10^4 Leptospiren/ml im Untersuchungsmaterial. Dabei wird für diese Diagnostik viel Erfahrung benötigt, da häufig nur eine geringe Anzahl von Leptospiren vorhanden und die Gefahr der Verwechslung mit Fibrin, Zelltrümmern oder anderen Bakterien groß ist. Falsch positive und falsch negative Diagnosen kommen häufig vor. Daher sind mikroskopische Untersuchungen mit anderen Methoden zu verifizieren. Die direkte Mikroskopie von Blut wird nicht als geeignete Routinemethode angesehen (TERPSTRA 2003; TURNER 1970).

2.4.1.2 Immunfluoreszenztest

Die Fluoreszenztechnik wird zum Nachweis der Leptospiren in Körperhöhlenflüssigkeit und vor allem in Gewebe angewandt. Der Vorteil liegt in der Möglichkeit, die Erreger bei kleinerer Anzahl und in stärker verunreinigtem Material nachweisen zu können. Die Unterscheidung von Serovaren oder Serogruppen ist möglich. Bei Verwendung einer Kombination aus verschiedenen Antiseren, die mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind, können im selben Präparat mehrere Serovare gleichzeitig nachgewiesen werden. Meistens wird die *Sandwich*-Methode benutzt mit einem primären Antiserum gegen Leptospiren (z. B. Kaninchen-Serum) und einem Anti-Spezies-Konjugat, das mit Fluoreszenzfarbstoff z. B. Fluorescein-Isothiocyanat markiert ist (FAINE 1982; FAINE 1994; SCHÖNBERG 1984). Bei einem Vergleich wurde von 75 Kühen Harn untersucht. Dabei konnten mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie bei 24 Proben Leptospiren nachgewiesen werden, durch die Isolierung jedoch nur bei 13 Proben der Immunfluoreszenz-positiven Proben. Auch beim Fluoreszenztest sind allerdings, wie im Dunkelfeldmikroskop, Sensitivität und Spezifität eingeschränkt. Bei Verfügbarkeit spezifischer und gut adsorbierter Seren kann der Fluoreszenztest als orientierende Untersuchung angesehen werden (BOLIN et al. 1989).

2.4.1.3 Kulturelle Isolierung

Leptospiren wachsen sehr langsam. Unter optimalen Bedingungen beträgt die Generationsdauer sieben bis zwölf Stunden. Als Probenmaterial können Blut, andere Körperflüssigkeiten und Gewebe verwendet werden, vorausgesetzt, der Patient ist nicht mit Antibiotika vorbehandelt. Normalerweise werden ca. 0,1 ml Blut oder eine andere Flüssigkeit bzw. zerkleinertes Gewebe dem Medium zugesetzt. Die Kultur wird bei der Bebrütung regelmäßig mittels Dunkelfeldmikroskopie auf Wachstum kontrolliert. Leptospiren sind in der Kultur frühestens nach einer Woche nachweisbar, eine Mindestkulturzeit von acht Wochen vor einer negativen Beurteilung ist anzusetzen. Zu dieser Zeit sind bei Infizierten bereits auch spezifische Antikörper gegen Leptospiren nachweisbar. Aus diesem Grund ist die Isolierung für eine schnelle Diagnostik ungeeignet. Sie ist außerdem in der Sensitivität durch Sekundärkontamination und Autolyse beeinträchtigt. Trotzdem hat die Kultur ihre Berechtigung, da die Isolierung von pathogenen Leptospiren beweisend für eine Infektion ist (TERPSTRA 2003). Thiermann (1984) empfiehlt für die Isolation von Leptospiren aus tierischen Geweben ein Medium, das Polysorbate-80 und bovines Serumalbumin (ELLINGHAUSEN, Jr. u. MCCULLOUGH 1965; THIERMANN 1984) enthält bzw. ein modifiziertes Nährmedium EMJH (ELLINGHAUSEN u. MCCULLOUGH 1967).

2.4.1.4 Tierexperimenteller Nachweis

Diese Methode wird aus Tierschutzgründen kaum mehr verwendet, da *in vitro* Kulturen vergleichbare Ergebnisse bringen. Bei Probenkontaminationen, die *in vitro* nicht beherrschbar sind, hätte der Infektionsversuch im Tier gewisse Vorteile.

Geeignet sind Goldhamster, Mäuse und Meerschweinchen. Je nach Größe des Versuchstieres werden 0,3-1,0 ml der aufbereiteten Proben beim Versuchstier intraperitoneal verimpft. Nach dem Auftreten von Krankheitserscheinungen werden Blut und Peritonealexsudat entnommen und mikroskopisch wie kulturell untersucht. Überleben die Tiere länger als zwei Wochen, wird ihr Blut serologisch untersucht (SCHÖNBERG 1984; TERPSTRA 2003).

2.4.1.5 Polymerase chain reaction (PCR)

Der Nachweis durch Amplifikation von Leptospiren-spezifischen DNA-Sequenzen ist bei verschiedenen klinischen Proben möglich. Als Probenmaterial werden Blut, *Liquor cerebrospinalis*, Urin und Gewebeproben verwendet. Die amplifizierte DNA kann mit der Agarosegelelektrophorese oder durch Hybridisierung mit Gensonden nachgewiesen werden. Dabei wird durch Einsatz von Gensonden, während der PCR oder danach, die Spezifität erhöht.

Als Ansatzpunkte für die Primerpaare sind mehrere Genloci beschrieben. Am häufigsten werden die Gene für die 16S oder 23S rRNA verwendet (HOOKEY 1992; MERIEN et al. 1992; WAGENAAR et al. 1994; WOO et al. 1997), aber auch *repetitive elements* kommen zum Einsatz (SAVIO et al. 1994; WOODWARD et al. 1991). Weitere Genorte, die für Sekretionsproteine bzw. Flagelline codieren, wurden für die Diagnostik ausgewählt (GRAVEKAMP et al. 1993; KEE et al. 1994). (LEVETT 2001; TERPSTRA 2003)

Zwei der beschriebenen Methoden, Merien (MERIEN et al. 1992) und Gravekamp (GRAVEKAMP et al. 1993), wurden mit klinischem Material evaluiert, wobei beide Methoden sensitiver waren als alle durchgeführten Standardmethoden einschließlich der Leptospirenkultur (BROWN et al. 1995; MERIEN et al. 1995). Brown et al (1995) untersuchte humanes Blut und Urin von 71 Patienten, die klinische Symptome einer akuten Leptospirose zeigten. Mit der PCR wurden bei 44 (62 %) der Patienten Leptospiren nachgewiesen, mittels Kultur wurde nur bei 34 Patienten (48 %) ein positiver Leptospiren-Nachweis geführt. Für die Falldefinition wurden Leptospiren-spezifische Antikörper bei 92 % der Patienten nachgewiesen.

Bei einem Infektionsversuch mit sechs Kalbinnen wurden mehrere Nachweismethoden für Leptospiren verglichen. Probenmaterial war Urin, der in kontinuierlichen Abständen von Tag fünf bis Tag 53 post infectionem aufgefangen wurde. Es standen fünf verschiedene PCR-Methoden, die kulturelle Isolierung, die Nukleinsäure-Hybridisierung und die Immunfluoreszenz zum Vergleich. Die beste PCR-Methode (GRAVEKAMP et al. 1993) erbrachte eine Spezifität von 100 % und eine Sensitivität von 91 %. Die höchste Sensitivität ergab sich jedoch aus der Kombination von zwei der folgenden Nachweismethoden, der PCR, der Kultur oder der Immunfluoreszenz (WAGENAAR et al. 2000). (LEVETT 2001)

Als Nachteil der PCR-Diagnostik ist die Gefahr von falsch positiven Ergebnissen zu nennen, die durch minimalste Verunreinigung des Arbeitsplatzes mit Leptospiren-DNA gegeben ist. Falsch negative Ergebnisse können dagegen durch Inhibitoren im Untersuchungsmaterial verursacht werden. Der Vorteil der PCR-Diagnostik besteht in der Möglichkeit, Leptospiren

sehr früh nach der Infektion bestätigen zu können, vor allem bevor der Nachweis von Isolaten oder Antikörpern gelingt. Dies ist gerade bei einer klinischen Fragestellung von großer Bedeutung. Für Fragen der Epidemiologie ist jedoch die Identifizierung des zu Grunde liegenden Serovars von Interesse. Diese Möglichkeit ist momentan nur bei wenigen der entwickelten PCR-Methoden (BROWN u. LEVETT 1997; OLIVEIRA et al. 1995; ZUERNER et al. 1995) vorhanden und dann meist an andere molekulargenetische Untersuchungsmethoden (weitere Differenzierung des Amplikons durch Sequenzierung oder Verdauung mit Endonukleasen) verknüpft. Insgesamt sind diese Strategien zur direkten Serovar-Diagnostik noch als aufwändig anzusehen, insbesondere da hierfür geeignete Methoden der indirekten Diagnostik zur Verfügung stehen.

(LEVETT 2001; TERPSTRA 2003)

2.4.2 Indirekte Nachweismethoden

2.4.2.1 Mikroagglutinationsreaktion (MAR)

Die Mikroagglutinationsreaktion wird als Goldstandard für die serologische Diagnostik bezeichnet, sie ist in der Spezifität unübertroffen und dient der Typisierung von Serovaren. Zudem ist sie für die indirekte serovarspezifische Diagnostik von Serumproben geeignet (FAINE 1982; TERPSTRA 2003).

Bei der MAR werden das zu untersuchende Serum und die Antigen-Suspension (Lebendkultur von Leptospiren) zu gleichen Teilen vermischt. Nach einer Inkubationszeit von $1\frac{1}{4}$ bis 4 Stunden bei einer Temperatur von 20-30 °C wird die Serum-Antigen-Mischung unter dem Dunkelfeldmikroskop auf Agglutinationen hin untersucht. Eine Reaktion wird als positiv erachtet, wenn mehr als 50 % der Leptospiren agglutiniert sind bzw. wenn weniger als 50 % sich frei bewegen können. Dabei wird zunächst im Vorversuch das Serum mit einer niedrigen Verdünnung von meist 1:25 mit verschiedenen Serovaren der Leptospiren untersucht. Bei einer positiven Reaktion wird mit dem reagierenden Serovar eine Verdünnungsreihe des Serums getestet. Das Serum wird mit PBS-Puffer verdünnt und die mikroskopische Untersuchung wird im Dunkelfeldmikroskop bei einer Vergrößerung von 100-400 fach durchgeführt (FAINE 1982; SCHÖNBERG 1984).

Die MAR wurde früher als Agglutinations-Lysis-Reaktion bezeichnet. Die Bezeichnung "Lysis" wird nicht mehr verwendet, weil die "Lysis" durch Bildung kleinster Agglutinate vorgetäuscht wird, wobei die Anzahl der Einzelorganismen bei mikroskopischer Betrachtung subjektiv stark vermindert erscheint. (SCHÖNBERG 1984).

Die verwendete Leptospirenkultur wird in EMJH oder Korthof-Medium gezüchtet und sollte annäherungsweise eine Dichte von $1-2 \times 10^8$ aufweisen. Als Antigen können neben lebenden Leptospiren auch abgetötete verwendet werden. Durch diese mit Formalin (0,2 %) abgetöteten Leptospiren ist die MAR nicht an Speziallaboratorien gebunden, welche die erforderlichen Stämme fortlaufend züchten und vorrätig halten. Außerdem ist der tägliche Umgang mit toten Leptospiren für das Laborpersonal sicherer. Bei Verwendung von formalinisiertem Antigen ist die Sensitivität, verglichen mit vitalem Antigen, niedriger und Kreuzreaktionen mit heterologen Serovaren erscheinen häufiger. Das Alter, die Dichte der Kultur und das verwendete Kulturmedium wirken sich ebenfalls auf die Reaktion aus. Antigene, die von alten Kulturen stammen oder von Kulturen mit einer hohen Dichte an Leptospiren, vermindern die Sensitivität der MAR (FAINE 1982; MYERS 1976; TURNER 1968).

Die MAR erfasst sowohl Antikörper vom IgM-Typ als auch vom IgG-Typ. Allerdings sind die Antikörper der IgM-Klasse weniger spezifisch und reagieren kreuzweise mit mehreren Serogruppen. IgG-Antikörper dagegen reagieren serovarspezifisch und sind für die Unterscheidung der Serogruppen durch die MAR geeignet (CHERNUKHA et al. 1976). Da in der frühen Phase der Infektion vor allem IgM-Antikörper ausgebildet werden, kann es daher zu unspezifischen Kreuzreaktionen mit anderen Serovaren kommen. Diese Kreuzreaktionen können während der ersten Wochen der Infektion sogar höhere Titerstufen erreichen als die Reaktion mit dem infizierenden Serovar. Man nennt dieses Phänomen paradoxe Reaktion. Weniger spezifische Antikörper fallen jedoch relativ schnell ab, während die serovarspezifischen Antikörper für längere Zeit (Monate bis Jahre) persistieren (ELLIS 1994; KMETY 1958; TERPSTRA 2003). Weitere Fehlerquellen, die bei der Agglutination auftreten können, sind unspezifische Agglutinationen, die durch einen schwach sauren pH-Wert der Leptospiren-Suspension bedingt sind, und Pseudoagglutinationen. Die Pseudoagglutination kann bei sehr schnell gewachsenen Kulturen auftreten. Man sieht dann Leptospirenhaufen, die aus hunderten von Spirochäten zusammengesetzt sind und ein strahlenförmiges

Aussehen haben. Diese so genannten „Brutnester“ können manchmal mit echten Agglutinationen verwechselt werden. Darum sind solche Leptospirenkulturen nicht für die Agglutinationsreaktion geeignet (KATHE u. MOCHMANN 1967).

Die Signifikanz von MAR-Titern bzw. der Grenztitern ist umstritten und viel diskutiert. Um eine genaue Aussage zum Infektionsstatus machen zu können, ist die Untersuchung eines Serumpaars nötig. Idealerweise ist der Anstieg von Antikörpern bei einer frischen Infektion um ein Vierfaches oder höher zu sehen. Oft wird jedoch nur eine Serumprobe zur Untersuchung eingesendet, was die Bewertung des Befundes erschwert. Zweifelsohne weisen Titer, die größer als 1:1000 sind und gehäuft in einer Herde vorkommen, auf ein akutes Geschehen in der Herde hin. Einige Autoren bewerten Proben erst ab einem Titer von 1:400 als sicher positiv (BREM 1984; SCHÖNBERG 1984). In der Beschreibung der WHO-Referenzmethode wird ein Titer von 1:100 als grenzwertig positiv bei der serologischen Diagnose der Leptospirose angesehen (FAINE 1982; HEATH u. JOHNSON 1994; TURNER 1968). Ellis sieht eine große Steigerung der Sensitivität in der Diagnostik bei einer positiven Bewertung ab der Verdünnungsstufe 1:10 (ELLIS 1984). Allerdings ist dieser Grenzwert mangels Spezifität für den generellen Gebrauch nicht praktikabel (HEATH u. JOHNSON 1994). Des Weiteren sollen für die Beurteilung von serologischen Befunden der Grad der endemischen Verbreitung innerhalb der Population und epidemiologische Faktoren

(Exposition) berücksichtigt werden. In Gebieten mit einer hohen Durchseuchung haben mehr Individuen persistierende Antikörper von vorangegangenen Infektionen. Somit ist die Beurteilung eines relativen niedrigen Titors dort schwieriger zu interpretieren als in Gegenden mit einer niedrigen Durchseuchung. Auch andere Krankheiten wie Legionellose, akute Entzündungen allgemein oder Autoimmunkrankheiten können mit Antikörpern verbunden sein, die zu Kreuzreaktionen führen.

Die MAR eignet sich auch für serovarspezifische epidemiologische Untersuchungen. (TERPSTRA 2003).

2.4.2.2 Objektträgeragglutinations-Schnelltest

Beim Objektträgeragglutinations-Schnelltest erfolgt die Zugabe von *Leptospira*-Antigen zu den Seren direkt auf einem Objektträger und ist mit dem bloßen Auge vor dunklem Hintergrund abzulesen. Als Antigen kommen entweder stabile, formalinisierte Pool-Antigene, zusammengesetzt aus verschiedenen Serovaren, oder ein thermoresistenter Extrakt, gewonnen aus dem hitzebehandelten Stamm *Leptospira biflexa* Patoc I, zur Verwendung. Dieses Verfahren kann als *Screeningtest* zum Antikörpernachweis im Serum eingesetzt werden. Er ist nur wenig sensitiv für die Diagnostik, aber nach Ansicht einiger Autoren zufriedenstellend für epidemiologische Fragen. Verglichen mit der MAR liegt die Spezifität nur bei 76,4 % (FAINE 1994; SCHÖNBERG 1984; WEBER et al. 1984).

2.4.2.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Innerhalb der serologischen Diagnostik gewinnt die Methode des ELISAs immer mehr an Bedeutung. Vorteile gegenüber der MAR bestehen in der einfacheren Testablesung und in der möglichen Unterscheidung von Immunglobulinklassen. Die Erfassung von IgM-Antikörpern ist ab dem dritten bis zehnten Tag nach der Infektion möglich und wird als sensitiver beschrieben als bei der MAR (CUMBERLAND et al. 1999). So kann zwischen Antikörpern von frischen und länger zurückliegenden Infektionen unterschieden werden. Unter Verwendung eines genusspezifischen Antigens kann die ELISA-Diagnostik Infektionen von verschiedenen Serovaren gleichzeitig erfassen (TERPSTRA et al. 1980). Die serovarspezifische Erfassung von Antikörpern mittels ELISA ist ebenfalls möglich (ADLER et al. 1982; SURUJBALLI u. MALLORY 2001; TERPSTRA 2003; THIERMANN u. GARRETT 1983). Für die Serodiagnostik von Hardjo-Infektionen beim Rind stehen mittlerweile mehrere kommerziell erhältliche ELISA-Kits zur Verfügung (WOODWARD et al. 1997).

Die Herstellung der verwendeten Antigene kann auf unterschiedliche Art und Weise geschehen: mittels Hitzeextraktion, Ultraschallbehandlung, Salzlösung, organischer Lösungsmittel oder Detergentien. Die schonendste Methode zur Extraktion von Leptospirenantigenen unter Erhalt der serovarspezifischen Eigenschaften ist die Verwendung von Detergentien (DURA 1993). Allerdings sind einige ELISAs in Abhängigkeit vom verwendeten Antigen weniger spezifisch als die MAR. Kreuzreaktionen in Verbindung mit dem Auftreten von anderen Krankheiten wurden auch bei Leptospiren-ELISAs beobachtet. Außerdem ist die IgM-Diagnostik mittels ELISA im Vergleich zur MAR unbefriedigend. Darum sollten Ergebnisse von ELISA-Untersuchungen mit einer MAR-Untersuchung bestätigt werden.

(FAINE 1994; TERPSTRA 2003)

2.4.2.4 Komplementbindungsreaktion (KBR)

Die KBR ist nur genusspezifisch, kann aber als *Screeningtest* vor einer MAR-Untersuchung durchgeführt werden, um MAR-Tests einzusparen. Komplementbindende Antikörper treten früh auf, sodass die KBR speziell für die Diagnose frischer Infektionen eingesetzt werden kann. Bei einem Infektionsversuch waren Antikörper mit der KBR vom vierten Tag bis maximal zur 23. Woche nachzuweisen (HODGES u. RIS 1974). Als Nachteil ist zu nennen, dass die KBR weniger sensitiv als die MAR ist (ELLIS et al. 1982).

(ELLIS 1984; SCHÖNBERG 1984)

3 Material und Methoden

3.1 Probenanzahl und Auswahl zur Untersuchung der Prävalenz von Leptospiren-Antikörpern

Für diese Untersuchung wurden Serumproben von Jungrindern mit einem Alter von 6 bis 24 Monaten verwendet, die für eine randomisierte BVD/MD-Prävalenzstudie bayernweit genommen wurden. Die Probennahme wurde von Amtstierärzten der bayerischen Veterinärämter durchgeführt. Außerdem wurden gleichzeitig Daten zum Betrieb und Management sowie Leistungs- und Gesundheitsdaten erhoben (siehe Abbildung 3). Der zu beprobende Betrieb und das zu beprobende Tier war den Amtstierärzten vorgegeben. Für die Beprobung wurden nur dann andere Tiere des Betriebes gewählt, wenn das per EDV vorgegebene Tier nicht vorhanden war (z. B. Verkauf). Pro Bestand wurde die Entnahme von 3 Serumproben von Rindern in einem Alter von 6 bis 24 Monaten angewiesen. Anschließend wurden Blutproben und Fragebögen an das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Dienststelle Oberschleißheim, geschickt. Dort wurden die Proben in dem Serumprobengefäß (Kabevette, Nümbrecht) unverzüglich zentrifugiert und das Serum in ein 1,0-ml-Standard-PPN-Tube-96 (Greiner®, Essen) gefüllt. Diese wurden in Micronic Reusable Tubeholder 96 (Greiner, Essen) sortiert und mit Capband-8 (Greiner, Essen) verschlossen. Bis zur Auswertung wurden die Serumproben bei ≤ -60 °C tiefgefroren.

3.1.1 Stichprobenumfang für die Prävalenzermittlung

Die Betriebswahl wurde aus einer Gesamtheit der rinderhaltenden Betriebe in Bayern randomisiert durchgeführt, um eine Ermittlung der Prävalenz unabhängig von anamnestischen Hinweisen zu den Betrieben zu gewährleisten. Als formale Auswahlkriterien bei der Wahl der Betriebe wurde das Vorhandensein weiblicher Rinder älter als 27 Monate vorgegeben (Ausschluss reiner Mastbetriebe). Zur Zeit der Erhebung wurden aus 60398 Rinderhaltern mit Milchvieh in Bayern vier Gruppen anhand der Betriebsgröße gebildet (Tabelle 2). Da eine Abhängigkeit der Seroprävalenz von der Betriebsgröße vermutet wurde, war die zahlenmäßig gleiche Belegung aller Betriebsgrößeklassen vorgegeben, um einen statistischen Vergleich diesbezüglich zu gewährleisten. Die nötigen Daten zur Einteilung wurden vom bayerischen Landesamt für Statistik und Datenverarbeitung gestellt. Für die Auswahl der einzelnen Betriebe wurde auf Daten der zentralen Rinderdatenbank zurückgegriffen. Um die vorher festgelegte Klassenaufteilung über HI-Tier (Herkunftssicherungs- und Informationssystem für Tiere) technisch realisieren zu können, wurden behelfsweise weibliche Tiere über 27 Monate als Kühe definiert.

Tabelle 2: Aufteilung der Größenklassen nach Milchkühen pro Herde

Größenklasse	Anzahl der Milchkühe
I	1–19
II	20–29
III	30–49
IV	>50

Zur Bestimmung der nötigen Mindestzahl von Betrieben pro Größenklasse und für eine statistisch hinreichend genaue Aussage wurde folgende Formel angewendet (KREIENBROCK u. SCHACH 2000).

$$n = \frac{1,96^2 * P * (1 - P)}{d^2}$$

n = Mindestzahl von Beobachtungen
P = Geschätzte Wahrscheinlichkeit
d = Abweichung vom Mittelwert

Als höchste Prävalenz wurden willkürlich 40 % angenommen (P = 0,4).

Bei einer Abweichung von +/- 5 % vom Mittelwert (d = 0,05) und einem Vertrauensbereich von 95 % wurde eine Mindestanzahl von 369 (n = 369) zu beprobenden Betrieben pro Größenklasse errechnet. Bei vier Größenklassen ergibt sich somit eine Gesamtzahl zu beprobender Betriebe von 1476.

3.1.2 Auswahl der Betriebe und der Tiere, Erhebung von epidemiologisch relevanten Daten in den Betrieben

Nach Aufteilung aller Betriebe in die Größenklassen wurden innerhalb der Größenklasse jeweils 369 Betriebe zufällig per Computer ausgewählt. Die Auswahl der Einzeltiere erfolgte ebenfalls zufällig und EDV-unterstützt (programmeigener Zufallsgenerator der Software Microsoft Access®). Dabei wurden pro Betrieb zehn Tiere in einem Alter von 6–24 Monaten, falls vorhanden, zur Beprobung vorausgewählt. Von den zehn ausgewählten Tieren im Betrieb war von den älteren darunter drei Seren zu gewinnen, die für die Leptospiren-MAR verwendet wurden. Auch wurden von diesen und fünf weiteren Rindern EDTA-Blutproben für die BVDV-Untersuchungen gewonnen. Zur eindeutigen Identifizierung wurden die Serumproben mit der Ohrmarkennummer des jeweiligen Tieres beschriftet.

Abbildung 3: Zu beantwortender Fragebogen bei der Probennahme (BRENDDEL 2003)

bayerisches Landesamt
für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Dienststelle Oberschleißheim

Veterinärstraße 2
85764 Oberschleißheim

Fragebogen für die Untersuchung der BVDV – Prävalenz in Bayern

Betriebsnr.	__ - __ - __ - __ - __ - __ - __ - __
Name, Vorname	
Straße, Haus-Nr.	
PLZ, Ort	
Landkreis (Kennzeichen)	

Datum der Probennahme	
erhebender Tierarzt	

Größenklasse	
--------------	--

.....

- (1) Gesamtzahl der Rinder
 davon Kühe
 Kalbinnen
 Jungvieh (für eigene Nachzucht)
 Kälber zur Mast im eigenen Betrieb
 Zuchtbullen
 Bullen/Färsen/Ochsen zur Mast im
 eigenen Betrieb

- (2) Mutterkuhhaltung (zutreffendes ankreuzen)
 ja
 nein
 falls ja, wie viele

- (3) Rasse (zutreffendes ankreuzen)
 Fleckvieh
 Braunvieh
 Schwarzbunt
 Rotbunt
 sonstige:

- (4) Räumliche* Trennung zwischen Mastplätzen und Kühen/Nachzucht vorhanden (zutreffendes ankreuzen)
 ja
 nein

- (5) Milchvieh und Nachzucht räumlich* getrennt (zutreffendes ankreuzen)
 ja

nein

- (6) Zukäufe pro Jahr
davon Kälber
Kalbinnen
tragende Tiere
Kühe (1. Laktation)
Kühe (2. Laktation)
sonstige

- (7) Woher stammen die Zukäufe vorwiegend? (zutreffendes ankreuzen)

Viehhandel
Viehmärkte
Ab-Hof-Kauf
sonstige

und aus welcher Region

Ausland, wenn ja welches
Inland, wenn ja
Bundesland
Landkreis

- (8) Möglichkeit zur abgesonderten* Haltung von Zukaufstieren (Quarantänestall)
(zutreffendes ankreuzen)

ja
nein

falls ja, wie lange werden die Tiere gesondert gehalten

- (9) Abgabe von Tieren als Pensionsvieh (Sammelweiden, Alpen, etc.)
(zutreffendes ankreuzen)

ja
nein

- (10) Aufnahme von Tieren als Pensionsvieh (zutreffendes ankreuzen)

ja
nein

- (11) BVD-Labordiagnostik bereits durchgeführt (zutreffendes ankreuzen)

ja
nein

falls ja, wann und welches Ergebnis
.....
.....

- (12) MD-Fälle im Betrieb bereits bekannt (zutreffendes ankreuzen)

ja
nein

falls ja, wie viele und wann?
.....
.....

- (13) Bestand gegen BVD geimpft (zutreffendes ankreuzen)

ja
nein

falls ja

ab welchem Alter wird geimpft

mit welchem(n) Impfstoff(en)

.....

wann war die letzte Impfung

in welchen Abständen wird geimpft

- (14) Sind insbesondere die Tiere aus der Stichprobe gegen BVD geimpft (bitte ankreuzen, falls dies zutrifft) und sind die Tiere in getrennten* Bereichen untergebracht (bitte als A, B oder C ankreuzen)

	A	B	C
OM-Nr. _ _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ -
OM-Nr. _ _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ -
OM-Nr. _ _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ -
OM-Nr. _ _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ -
OM-Nr. _ _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ -
OM-Nr. _ _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ -
OM-Nr. _ _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ -
OM-Nr. _ _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ -
OM-Nr. _ _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ -
OM-Nr. _ _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ -

- (15) Wurden PI-Tiere abgeschafft (zutreffendes ankreuzen)

ja
nein

falls ja, wann und wie viele

.....

.....

- (16) Folgende Krankheitserscheinungen in den letzten 2 Jahren im Betrieb gehäuft aufgetreten (zutreffendes umranden: + selten; ++ gelegentlich; +++ häufig)

Aborte	+ / ++ / +++
Umrindern	+ / ++ / +++
unregelmäßige, v.a. verlängerte Brunst	+ / ++ / +++
Fruchtbarkeitsstörungen mit Vaginalausfluß	+ / ++ / +++
Missgebildete Kälber	+ / ++ / +++
grippale Infekte (+++, wenn über 50% der Tiere betroffen)	+ / ++ / +++
Durchfälle (+++, wenn über 50% der Tiere betroffen)	+ / ++ / +++
hämorrhagische Erkrankungen	+ / ++ / +++
Klauenprobleme	+ / ++ / +++
welcher Art waren die Klauenprobleme
.....
Mastitiden	+ / ++ / +++
Todesfälle	+ / ++ / +++

- (17) Anzahl der Tiere, die in den letzten 2 Jahren abgegangen sind
-
- Abgangsgründe

.....

.....

.....

-
- (18) Anteil der künstlichen Besamung in %
- (19) Erstbesamungserfolg in %
- (20) Non-Return-Rate
- (21) Trächtigkeitsindex (mittlere Anzahl von Besamungen pro tragend
gewordener Kuh)
- (22) Nichtträchtigkeitsindex (mittlere Anzahl von Besamungen pro nicht
tragend gewordener Kuh)
- (23) Mittlere Güstzeit
- (24) Milchleistung (gleitender Herdendurchschnitt)
- (25) Schwankungen insbesondere Einbrüche in der Milchleistung durch ungeklärte Faktoren in den
letzten 2 Jahren aufgetreten (zutreffendes ankreuzen)
ja
nein
- (26) Sonstige Anmerkungen:

Vielen Dank für ihre Mitarbeit!

Die aus dem Fragebogen gewonnenen Daten werden streng vertraulich und anonym behandelt!!

* räumliche Trennung: Separates Gebäude oder separater Bereich ohne offenen Durchgang

3.2 Proben zum Nachweis von Leptospiren in abortierten Rinderfeten und Serumproben zur Bestandsdiagnostik

3.2.1 Fetaler Labmageninhalt für den Leptospiren-Nachweis

Zum Nachweis von Leptospiren wurde Labmageninhalt von abortierten Rinderfeten untersucht. Das Probematerial stammt von abortierten Rinderfeten, die an das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim und Erlangen eingesendet wurden. Die Proben wurden bei der Sektion von den Mitarbeitern der Abteilung für Pathologie entnommen. Außerdem wurde Probenmaterial vom Institut für Pathologie und vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät München gesammelt. Die Probennahme erfolgte am frisch geöffneten Labmagen mittels einer sterilen Einwegspritze. Bis zur Untersuchung wurden die Proben bei $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für bis zu vier Wochen aufbewahrt.

Insgesamt konnten in dem Zeitraum von Mai bis Dezember 2003 154 Labmagenproben gesammelt werden. Davon stammten 134 Proben vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Dienststelle Oberschleißheim, 17 Proben vom bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Dienststelle Erlangen, und drei Proben von den Instituten der Tierärztlichen Fakultät.

3.2.2 Beschaffung von Serumproben aus dem Bestand der untersuchten Feten

Von 57 Feten war es möglich, für eine serologische Untersuchung Herzblut zu gewinnen. Bei 31 Fällen wurden insgesamt 55 Serumproben unaufgefordert zur serologischen Untersuchung mitgeschickt. Dabei handelt es sich entweder um Blutproben von Kühen, die abortiert hatten, oder um Blutproben von Rindern, die aus demselben Bestand stammen.

Für die Betrachtung von Zusammenhängen zwischen Leptospiren-Nachweis und dem serologischen Geschehen wurden die einsendenden Tierärzte, soweit angegeben, oder die Landwirte angeschrieben und zu einer serologischen Untersuchung ihres Bestandes aufgefordert. Dies geschah in Verbindung mit der Befundmitteilung zum Leptospiren-Nachweis. Es sollte von allen Kühen, die abortiert hatten, und von fünf Rindern im Alter von 6 bis 24 Monaten Serumproben genommen werden. Auf dem Untersuchungsantrag waren außerdem das Alter des Tieres, die Haltungsform und das Geschlecht der Jungrinder anzugeben. Insgesamt schickten 15 Betriebe 104 Serumproben ein. Davon stammten 45 Serumproben von Kühen, die verworfen hatten, 55 Serumproben von Jungtieren und vier Serumproben von Kühen, die in derselben Gruppe des Laufstalles lebten, aus der ein abortierter Fetus zur Untersuchung gebracht wurde.

3.3 Die Mikroagglutinationsreaktion

3.3.1 Verwendete Antigene

Zum Nachweis von Leptospirenantikörpern mit der Mikroagglutination wurde Antigen in Form von lebenden Leptospiren beigegeben. Dafür wurden die verschiedenen Leptospirenstämme kontinuierlich gezüchtet. Die am häufigsten vorgefundenen Serovare bei Blutproben von Rindern, die zur Routineuntersuchung an das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Dienststelle Oberschleißheim, eingeschickt wurden, finden bei der vorliegenden Untersuchung Verwendung (BREM 2003). Dabei handelt es sich um sechs verschiedene Serovare aus sechs verschiedenen Serogruppen.

Tabelle 3: Die verwendeten Serovare zur Durchführung der Mikroagglutinationsreaktion:

Spezies	Serogruppe	Serovar	Stamm
nicht definiert	Sejroe	hardjo	Isolat des LGL
<i>Leptospira interrogans</i>	Canicola	canicola	Hond Utrecht IV
<i>Leptospira interrogans</i>	Grippotyphosa	grippotyphosa	Moska V
<i>Leptospira interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	copenhageni	Mus 20
<i>Leptospira interrogans</i>	Pomona	pomona	Pomona
nicht definiert	Australis	bratislava	Isolat aus Berlin

3.3.2 Kultivierung der Leptospiren

Die beschriebenen Leptospirenstämme wurden mit einem speziellen Leptospirengrundnährmedium gezüchtet. Das BSA-Tween-Medium wird mit und ohne Kaninchenserum 0,5–2 % eingesetzt. Es besteht aus zwei Anteilen: 900 ml Leptospirose-Basis-Medium EMJH und 100 ml *Enrichment*.

Zur Herstellung des Leptospirose-Basis-Mediums werden 2,3 g des EMJH-Mediums der Fa. Difco (Labor Detroit) in 900 ml A. dest. gelöst und anschließend autoklaviert.

Für die Herstellung des *Enrichment* wurden folgende Stammlösungen in A. bidest. hergestellt:

- 0,5 g Eisensulfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) in 100 ml
- 1,0 g Brenztraubensäure ($\text{CH}_3\text{COCOO Na}$) in 10 ml
- 0,4 g Zinksulfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) in 100 ml
- 1,5 g Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
+ 1,5 g Calciumchlorid ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) zusammen in 100 ml
- 10,0 g Glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) in 90 ml
- 10,0 g Tween 40 in 90 ml
- 10,0 g Tween 80 in 90 ml
- Tween wird im Wasserbad bei 56 °C gelöst.
- 0,002 g Cyanocobalamin (Vit. B₁₂) in 100 ml

Für 100 ml *Enrichment* wurden 10 g bovines Serumalbumin (BSA) (z. B. Serva[®] 11930) in 50 ml A. bidest. auf dem Magnetrührer gelöst.

Zu der 50-ml-BSA-Lösung wurden folgende Mengen der bereits hergestellten Stammlösungen zugegeben und anschließend mit A. bidest. auf 100 ml aufgefüllt:

- 1 ml Brenztraubensäure
- 1 ml Glycerin
- 1 ml Magnesium-Calciumchlorid
- 1 ml Zinksulfat
- 1 ml Cyanocobalamin
- 3,5 ml Tween 40
- 9,0 ml Tween 80
- 10 ml Eisensulfat
- evt. Zugabe von Kaninchenserum 0,5 %-2 %
- pH-Wert einstellen bei 7,25–7,30 mit 1 N NAOH

Die fertige *Enrichment*-Lösung wurde für den späteren Bedarf bei -20° C eingefroren.

Das BSA-Tween-Medium wird aus einem Teil *Enrichment* und neun Teilen EMJH hergestellt und steril filtriert (Seitz-Filter, Größe 14 D)

Für die Kulturen von Serovar hardjo, grippotyphosa, pomona und bratislava wurden 2 % Kaninchenserum zur *Enrichment*-Lösung gegeben.

Aliquote der *Leptospira*-Kulturen wurden jeweils nach Kontrolle auf Eignung unter dem Dunkelfeldmikroskop (Dichte, Vitalität, Kontamination mit anderen Bakterien) zum Beimpfen von neuen Kulturen verwendet. Das Abfüllen des BSA-Tween-Mediums in Reagenzgläser und das Impfen der neuen Kulturen geschah an einer sterilen Sicherheitswerkbank. Dabei wurde ca. ein Teil der Impfkultur zu neun Teilen BSA-Tween-Medium gegeben. Die Inkubation wurde bei 29 °C im Brutschrank für drei bis sieben Tage durchgeführt.

Vor Verwendung der Kultur für die MAR wurde sie stets makroskopisch und mikroskopisch auf Dichte der Leptospiren und Kontamination mit anderen Bakterien kontrolliert. Die Kulturen mit den Arbeitsstämmen wurden maximal zwei Wochen für die MAR verwendet.

3.3.3 Durchführung der Mikroagglutination

Die verwendete Untersuchungstechnik basiert auf den Modifizierungen der Agglutinationsreaktion von Cole (COLE, Jr. et al. 1973) und stützt sich auf die Ausführungen der deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (SCHÖNBERG 1984).

Zur Erstellung der Serumverdünnung wurde eine phosphatgepufferte NaCl-Lösung (PBS) verwendet. Deren Herstellung erfolgte durch Auflösung von 8,5 g NaCl, 0,85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 0,25 g KH_2PO_4 in einem Liter Aqua bidest.

Die Serumverdünnung (1:25) wurde in einem 96-Loch-Masterblock (Greiner[®], Essen) erstellt. Dafür wurden zuerst in jede Kavität 600 µl PBS-Puffer vorgelegt und anschließend 25 µl Serum dazugegeben und vermischt.

Die Durchführung des Vorversuchs erfolgte mit den sechs Antigenstämmen bei einer Serumverdünnung von 1:50. Für die Untersuchung von Herzblut abortierter Feten wurde eine Serumverdünnung von 1:5 gewählt.

Für jedes Serovar wurde eine separate 96-Loch-Mikrotiterplatten (Mictotest Plate 96- Well, Flat bottom, Sarstedt[®]) verwendet. In die Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurde 50 µl von jedem Serum mit der Vorverdünnung 1:25 einpipettiert. Dazu wurden 50 µl Antigen des jeweiligen Serovars in jede Kavität zugegeben und anschließend der Ansatz auf dem Schüttler vermischt. Nach der Inkubation im Brutschrank bei 29 °C für 1½ Stunden wurde der Ansatz noch einmal auf dem Schüttler kurz vermischt, um dann im Dunkelfeldmikroskop bei 100-facher Vergrößerung abgelesen zu werden.

Die Titerbestimmung mit Seren, die im Vorversuch positiv reagiert hatten, erfolgte im Hauptversuch mit einer \log_2 -Verdünnungsreihe ausgehend von 1:50 bis 1:6400. Bei Reaktionen, die bei einer Verdünnung von 1:6400 noch reagierten, wurde der Ansatz mit höheren Verdünnungsstufen angefügt. Als Vorlage wurden 50 µl PBS-Puffer in Reihe B bis H einer Mikrotiterplatte geben. In die Reihe A wurden jeweils 100 µl Serumverdünnung einer Serumverdünnung 1:25, deren Titerhöhe bestimmt werden soll, gefüllt. Danach wurden mit einer Mehrfachpipette jeweils 50 µl von Reihe A bis H überführt und vermischt, aus Reihe H wurden zum Schluss 50 µl verworfen.

Nach Zugabe von 50 µl Antigen des im Vorversuch positiv reagierenden Serovars in jede Kavität wurde die Mikrotiterplatte geschüttelt. Die Inkubation im Brutschrank bei 29 °C erfolgte für 1½ Stunden. Nach nochmaligem kurzem Schütteln des Ansatzes wurde dieser im Dunkelfeldmikroskop bei 100-facher Vergrößerung abgelesen.

Eine Reaktion wurde als positiv erachtet, wenn mehr als 50 % der Leptospiren agglutiniert sind bzw. wenn weniger als 50 % sich frei bewegen konnten.

Abbildung 4: Nicht agglutinierte Leptospirenkultur im Dunkelfeldmikroskop bei einer Vergrößerung von 1:100

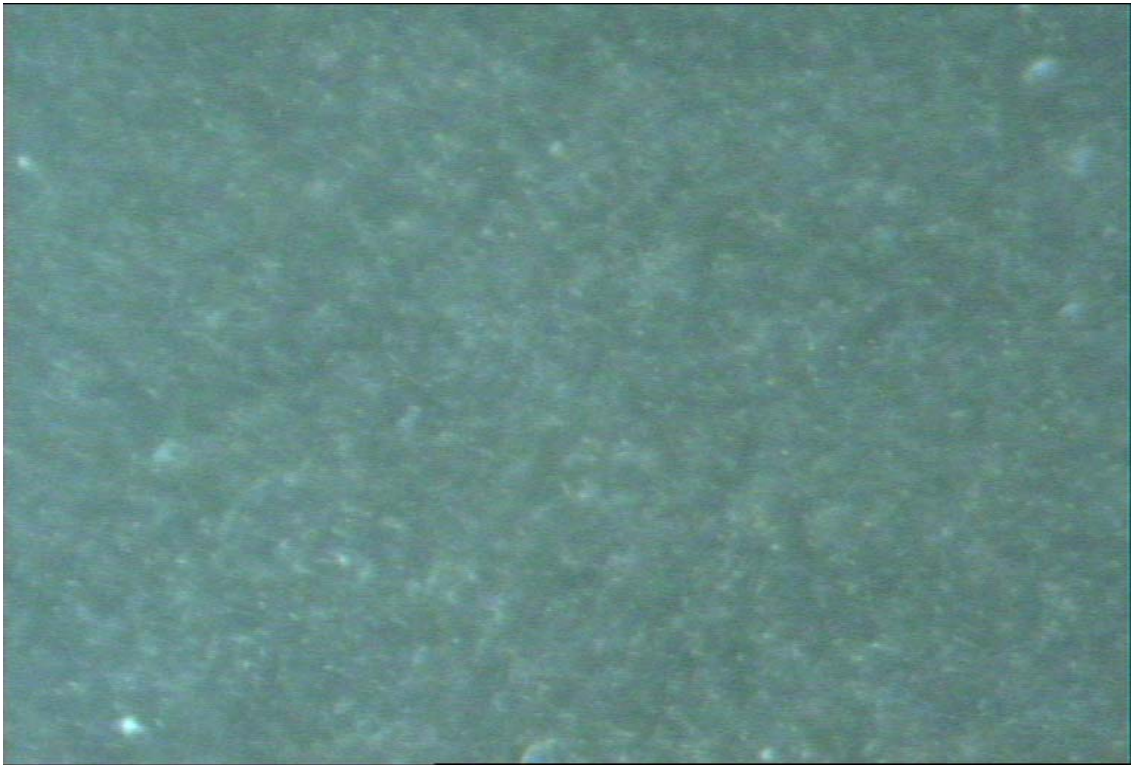
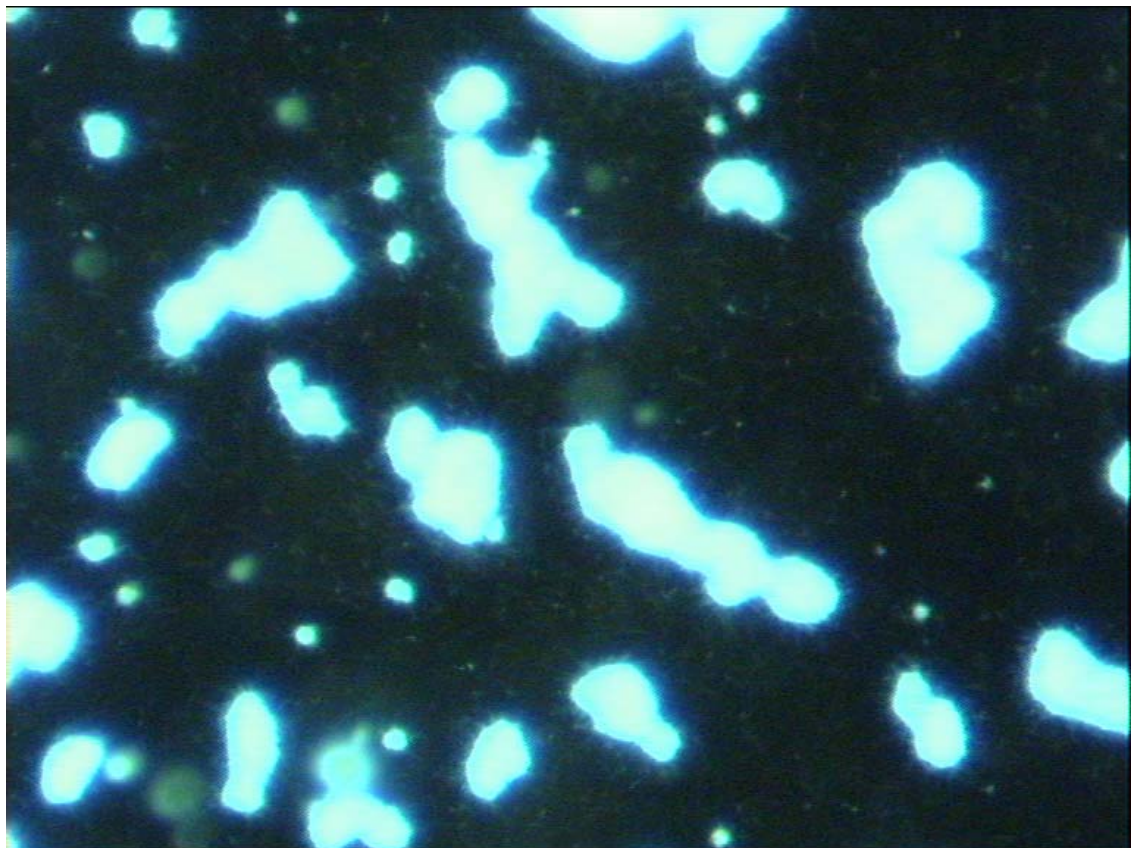


Abbildung 5: Stark agglutinierte Leptospirenkultur im Dunkelfeldmikroskop bei einer Vergrößerung von 1:100



3.4 *Leptospira*-spezifische PCR (polymerase chain reaction)

3.4.1 Vergleich zweier Methoden zur Ermittlung der optimalen DNS-Extraktion sowie Überprüfung der Nachweisgrenze der PCR im Probenmaterial

Die Sensitivität der verwendeten PCR zum Nachweis von Leptospiren wurde anhand von Labmageninhalt eines Rinderfetus, der mit Leptospiren versetzt wurde, ermittelt. Dieser Labmageninhalt stammte von einem Fetus aus dem Münchner Schlachthof und wurde einer Kuh entnommen, die klinisch gesund war. Um eine quantitative Aussage treffen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe einer Leptospirenkultur (Serovar hardjo) erstellt, deren Bakterienkonzentration mittels Zählkammer unter einem Dunkelfeldmikroskop bestimmt wurde. Ein Aliquot (20 µl) des jeweiligen Verdünnungsschrittes wurde je sechs Proben mit Labmageninhalt (180 µl) zugesetzt. Außerdem wurde ein Labmageninhalt ohne Leptospirenkultur als Negativkontrolle untersucht.

Die anschließende Extraktion der DNS erfolgte mittels des von Richtzenhain et al. (2002) beschriebenen Extraktionsprotokolls mit Proteinase K/Phenol und mithilfe des QIAamp® DNA Mini Kit (Quiagen GmbH, Hilden). Je Verdünnungsstufe und Methode wurde DNA aus drei Proben parallel extrahiert.

3.4.2 Extraktion der Leptospiren-DNA aus Labmageninhalt

Zur Extraktion der DNS aus dem Probenmaterial wurde das QIAamp® DNA Mini Kit (Quiagen GmbH, Hilden) verwendet. Bei der vorherigen Prüfung dieser Extraktionsmethode für die Leptospirose-PCR erwies sich diese als geeignet (siehe 4.3.1). Außerdem hat diese Methodik gegenüber anderen Protokollen den Vorteil der einfacheren Standardisierung (REISCHL 2003). Das Extraktionsprotokoll (*tissue protocol*) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Das restliche Material an Labmagenproben wurde bei –20 °C erneut eingefroren. Folgende Schritte wurden für eine DNS-Extraktion durchgeführt:

Je nach Anzahl der Proben wurden die 1,5 ml Eppendorfgefäße beschriftet und 20 µl Quiagen Proteinase K vorgelegt.

Das Probenmaterial (Labmageninhalt) wurde 15 s suspendiert (Vortex), 200 µl davon in das 1,5-ml-Eppendorfgefäß zugegeben und der Ansatz noch mal 15 s suspendiert.

Nach einer Inkubation von mindestens einer Stunde bei 56 °C im Thermomixer (unter Bewegung) wurde der Inhalt der Eppendorfröhrchen zunächst kurz abzentrifugiert und anschließend wurden jeweils 200 µl vom Quiagen AL-Puffer zugegeben. Weiter wurden die Ansätze 15 s suspendiert, kurz abzentrifugiert und nochmals bei 70 °C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden den Ansätzen 200 µl Ethanol (96-100 %) zugegeben, nochmals für 15 s suspendiert und kurz abzentrifugiert.

Von den Eppendorfgefäßen wurden die Ansätze daraufhin in die QIAamp spin column pipettiert, verschlossen, bei 6 000 g für 1 min zentrifugiert und die QIAamp spin column auf ein neues 2-ml-Gefäß gesteckt.

Zum Waschen der Säulen wurde zunächst 500 µl Quiagen AW1-Puffer in jede QIAamp spin column gegeben, diese dann bei 6 000 g für 1 min abzentrifugiert und in neue 2-ml-Gefäße gesteckt.

Ein nochmaliges Waschen der Ansätze erfolgte durch Zugabe von 500 µl Quiagen AW2-Puffer in die QIAamp spin column. Die abschließende Zentrifugation der QIAamp spin column erfolgte bei 20 000 g für 2 min, gefolgt von Gefäßwechsel und noch einmal bei 20 000 g für 1 min.

Zur Lösung der DNS aus den Säulen wurden die QIAamp spin column in sterile 1,5-ml-Eppendorfröhrchen gesteckt, 200 µl Quiagen AE-Puffer zugegeben, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 6 000 g für 1 min zentrifugiert.

Bis zur weiteren Bearbeitung der DNS-Proben wurden diese bei 5 °C (+/- 3 °C) gelagert.

3.4.3 Durchführung der PCR

Die PCR wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg durchgeführt. Die molekulare Leptospirendiagnostik war dort bereits etabliert. Das verwendete Protokoll der PCR basiert auf den Ausführungen von Mérien (MERIEN et al. 1992) und bezieht sich auf ein 331 Basenpaare großes Amplikon (Primer A, B) bzw. 289 Basenpaare großes Amplikon bei der *nested* PCR (Primer C, D). Das replizierte DNA-Fragment ist ein Teil des Gens, das für 16S rRNA codiert. Die verwendeten Primer sind der Veröffentlichung von Mérien entnommen.

Verwendete Primer:

PCR

A: 5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3'

B: 5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3'

nested-PCR

C: 5'-CAAGTCAAGCGGAGTAGCAA-3'

D: 5'-CTTAACCTGCTGCCTCCCCTA-3'

Zur Durchführung der *real time PCR* wurde das LightCycler-System (Roche Diagnostics, Penzberg) verwendet. Die Detektion der replizierten DNA basiert auf dem FRET-Prinzip (*fluorescence resonance energy transfer*) unter Verwendung von *Hybridisation Probes* bestückt mit dem Fluoreszenzfarbstoff LC Red 640. Die Nukleotidsequenzen dieser *Hybridisation Probes* wurden von Reischl, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg, entwickelt (Publikation in Vorbereitung). Jede Probe wurde mit einer *nested*-PCR (Primer C, D) überprüft.

Von der kühl (5° C +/- 3° C) gelagerten DNS wurden 5 µl dem bereits hergestellten und in Kapillaren (LightCycler™ Capillaries, Roche Diagnostics, Penzberg) gefüllten *Mastermix*-Ansatz zugegeben. Ebenso wurden 5 µl aus den Kapillaren des ersten PCR-Durchgangs zu dem *Mastermix*-Ansatz für die *nested*-PCR bestückten Kapillaren gegeben.

Die Herstellung des *Mastermix*-Ansatzes erfolgte in einem separaten Raum. Folgende Angaben beziehen sich auf eine Probe und wurden der jeweiligen Probenzahl entsprechend hochgerechnet und anschließend pipettiert:

- 2 µl Gebrauchs-*Mastermix*-Lösung (Cup rot), LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche Diagnostics, Penzberg)
- 2,4 µl MgCl₂ (4 mM)
- 0,1 µl Primer Lep-ME-A (= 0,5 µM bei C = 100 µM) (Metbion, Martinsried)
- 0,1 µl Primer Lep-ME-B (= 0,5 µM bei C = 100 µM) (Metbion, Martinsried)
- 1,33 µl *Hybridisation Probes* Lep-HP-1 (= 0,2 µM bei C = 3 µM) (TIB[®] Metbiol, Berlin)
- 1,33 µl *Hybridisation Probes* Lep-HP-2 (= 0,2 µM bei C = 3 µM) (TIB[®] Metbiol, Berlin)
- 7,55 µl A. dest.

Für die Herstellung des *Mastermix*-Ansatzes der *nested*-PCR wurde analog vorgegangen, jedoch folgende Primer verwendet:

- 0,1 µl Primer Lep-ME-C (= 0,5 µM bei C = 100 µM) (Metbion, Martinsried)
- 0,1 µl Primer Lep-ME-D (= 0,5 µM bei C = 100 µM) (Metbion, Martinsried)

Für die Negativ-Kontrolle wurde einer Kapillare statt DNA nur Quiagen AE-Puffer beigelegt. Für die Positiv-Kontrolle wurde der Kapillare genomische *Leptospira interrogans* DNA zugesetzt. Diese DNA stammt von einer Leptospiren-Kultur (Serovar hardjo) aus dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim. Die Extraktion der DNA erfolgte analog zu den Proben mit Labmageninhalt.

Für die Amplifikation fand folgendes *thermocycler*-Protokoll Verwendung. Für die initiale Denaturierung und um die FastStart Taq DNA Polymerase zu aktivieren wurden die Kapillaren für 10 min auf 95 °C erhitzt. Danach wurde für 50 Zyklen auf 95 °C für 5 s aufgeheizt, anschließend auf 55 °C für 10 s abgekühlt, um dann wieder auf 72 °C für 20 s aufzuheizen. Der Fluoreszenzwert der Reaktionsgemische wurde bei jedem Zyklus mit einer Wellenlänge von 640 nm fotometrisch gemessen.

Als ein positives Ergebnis wurde bewertet, wenn neben einem Anstieg des Fluoreszenzwertes der Schmelzpunkt der Sonden zwischen 61 °C und 62 °C lag.

3.5 Kulturelle Isolierung der Leptospiren aus PCR-positiven Labmagenproben

Rückstellproben von den Labmageninhalten, die in der PCR-Untersuchung ein positives Ergebnis erbrachten, wurden erneut aufgetaut, um eine Anzucht von Leptospiren daraus zu versuchen.

Die Kultivierung wurde unter vier verschiedenen Bedingungen versucht. Das verwendete Nährmedium EMJH und das dazugehörige *Enrichment* wurden wie oben beschrieben hergestellt. Dabei wurden 200 ml von EMJH-Medium mit 0,75 g Agar (Agar, purified BBL, Bosch) vermischt und autoklaviert. In die noch warme Agarmischung wurden zur Herstellung des Nährmediums nochmals 250 ml EMJH (autoklaviert), 50 ml *Enrichment*-Lösung und 5 ml Kaninchenserum gemischt.

Zur Unterdrückung des Wachstums von anderen Bakterien wurden bei zwei der Nährmediumansätze Antibiotika zugesetzt. Einem Nährmedium wurden 50 mg Fluorouracil (Sigma) zugegeben, das andere enthielt zusätzlich zu Fluorouracil (Sigma) 5 mg Vancomycin (Vancomycin-HCl, 500 mg Eli Lilly GmbH).

Bei allen drei Ansätzen wurde abschließend der pH-Wert von 7,2 mit 1N-NaOH eingestellt und die Medien wurden steril filtriert.

Das Nährmedium ohne Hemmstoffe wurde auch ohne Agar eingesetzt. Hier wurden 450 ml EMJH-Medium autoklaviert und anschließend mit 50 ml *Enrichment* vermischt. Zur Bebrütung wurden alle Medien zu 6–7,5 ml in Schraubkappenröhrchen abgefüllt.

Das restliche Material der Labmagenprobe, ca. 2,0 ml, wurde gleichmäßig auf die Schraubkappenröhrchen mit den vier verschiedenen Medien verteilt und bei 29 °C bebrütet. Alle 7 d wurden die Nährmedien auf Leptospirenwachstum und Kontamination mit anderen Bakterien kontrolliert. Insgesamt wurden die Proben für einen Zeitraum von drei Monaten beobachtet.

3.6 Statistische Auswertung der Fragebögen

Die Angaben der Fragebögen wurde zunächst für die EDV (Microsoft Access®) erfasst, anschließend zu den Herden in Bezug gesetzt und einer statistischen Bewertung unterzogen. Als serologisch positive Betriebe wurden alle definiert, die mindestens ein Tier mit einem Leptospira-MAR-Titer von 1:100 oder größer hatten. Betriebe mit Reagenten der Serovare canicola, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa, pomona und bratislava wurden für die statistische Auswertung zusammengefasst. Dagegen wurden die Betriebe mit Serovar hardjo-Antikörpern positiven Tieren aufgrund des endemischen Charakters der Infektion separat betrachtet. Der Vergleich der Betriebe jeweils mit und ohne Seroreagenten bezüglich der anamnestisch erhobenen Daten zu den Betrieben erfolgte statistisch. Bei allen quantitativen Angaben (z. B. Gesamtzahl der Rinder) wurden zunächst Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen für alle betroffenen und negativen Betriebe errechnet. Zur Ermittlung der Unabhängigkeit beider Mittelwerte (positive Betriebe – negative Betriebe) wurde die Signifikanz mithilfe des Student t-test bestimmt. Signifikanzen für Vierfeldertafeln wurden mittels χ^2 -Test bzw. bei Besetzung eines Feldes mit weniger als 6 Treffern mit Fisher's Exact Test geprüft. Bei zweiseitiger Fragestellung wurde für das Ergebnis $p < 0,05$, bei Anwendung der jeweiligen Verteilungsfunktion, das Merkmal als signifikant, für $p < 0,01$ als hoch signifikant und für $p < 0,001$ als höchst signifikant unterschiedlich in den Gruppen angegeben. Konfidenzintervalle für binäre Ereignisse wurden mithilfe der Binomialverteilung bei jeweils einem Vertrauensbereich von 95 % errechnet. Die Exploration erfolgte mit dem Programm Quattro Pro® (Borland) und dem Programm SAS 8.2 (Statistic Analysis System).

4 Ergebnisse

4.1 Durchführung der Beprobung

Insgesamt wurden 1476 Betriebe zur Beprobung ausgewählt. Zwischen Anfang April und Ende September des Jahres 2003 wurden 3463 Serumproben aus 1213 Betrieben eingesendet und untersucht. Die verbleibenden 263 Betriebe wurden aus verschiedenen Gründen nicht beprobt (zwischenzeitliche Betriebsaufgabe, Ablehnung des Landrates, kein Tier für die zu beprobende Altersgruppe verfügbar, Ablehnung der Probennahme durch das zuständige Veterinäramt aus sonstigen Gründen). Der vorgesehene Zeitraum April bis Mai 2003 für Probenentnahme konnte teilweise nicht eingehalten werden. Daher ist auch das Alter der mit 6-24 Monaten vorausgewählten Rinder überschritten worden. Im Durchschnitt waren die Probanden 613 Tage alt.

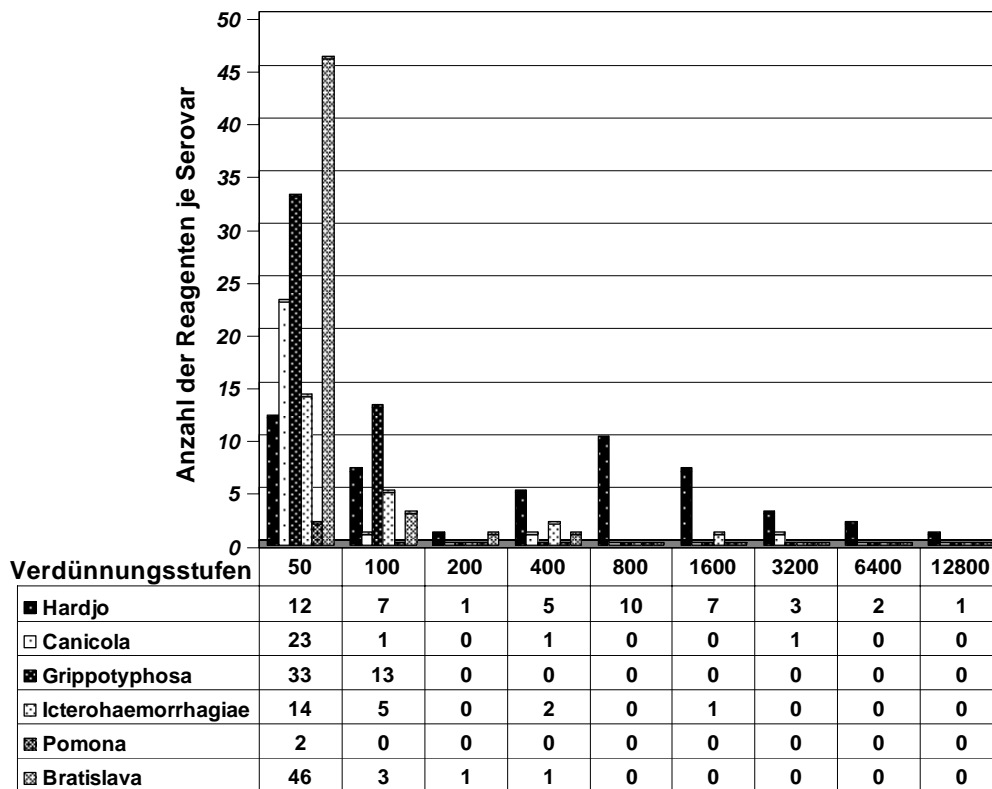
4.2 Serologische Ergebnisse

4.2.1 Häufigkeit der einzelnen Serovare, bezogen auf Rinder und Herden

Von den 3463 untersuchten Seren reagierten 181 Seren bei einer Eingangsverdünnung von 1:50 in der MAR positiv. Die 181 positiven Seren verteilten sich auf 147 verschiedene Betriebe (12,12 %) bei insgesamt 1213 untersuchten Betrieben.

Die Höhe der Endtiter war bei den unterschiedlichen Serovaren deutlich verschieden. Bei allen Serovaren, außer Serovar hardjo, war die Mehrzahl der positiven Reaktionen vorwiegend bei den geringen Titerstufen zu messen, ab einer Verdünnungsstufe von 1:200 bzw. 1:400 reagierten nur noch wenige Seren. Die 36 für Serovar hardjo positiv Seren reagierten bei vergleichsweise hohen Titern, bei 28 Seren lag der Titer bei $\geq 1:400$. Eine positive Bewertung der Seren, bis zu einer Serumverdünnung von 1:50, wird jedoch als wenig spezifisch betrachtet. Aus diesem Grund werden alle Ergebnisse mit einem Titer $< 1:100$ in der MAR für die weitere Auswertung als negativ gewertet. In Abbildung 6 sind die einzelnen Titer der Reagenten dargestellt.

Abbildung 6: Anzahl der Reagenten (MAR > 1:50) gegen den einzelnen Sero-var, im Bezug zum Titer



(3268 Tiere MAR < 1:50)

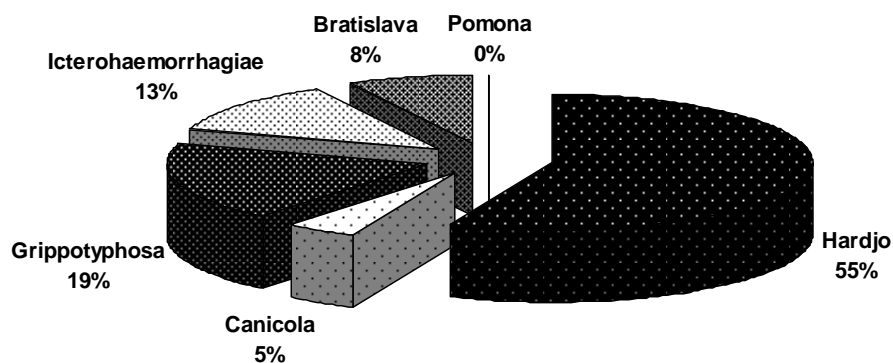
Betrachtet man die Ergebnisse ab der Verdünnungsstufe 1:100 und größer, so beträgt die Seroprävalenz unabhängig vom Sero-var, bei 63 positiven Seren von insgesamt 3463 untersuchten Seren, 1,82 %. Das Konfidenzintervall für die ganze Population wurde aus diesen Zahlen und mithilfe der Binomialverteilung errechnet. Die Prävalenz in Bayern liegt für das gewählte Stichprobenmaterial somit zwischen 1,51 % und 2,22 %, bei einem Vertrauensbereich von 95 %.

Durchschnittlich waren die seropositiven Rinder zum Zeitpunkt der Probennahme 2,0 Jahre alt, während die restlichen Tiere im Durchschnitt 1,67 Jahre alt waren. Der Unterschied ist hoch signifikant (*Student t-test*, $p = 0,0062$).

Bei zwei der Seren wurde eine Doppelreaktion gegenüber zwei verschiedenen Serovaren festgestellt. Dabei reagierten die Serovare icterohaemorrhagiae und canicola mit fast gleich hohen Titern.

Von allen positiven Seren kommt Serovar hardjo mit 55 % am häufigsten vor, gefolgt von Serovar grippotyphosa mit 18 %, Serovar icterohaemorrhagiae mit 13 %, Serovar bratislava mit 8 % und Serovar canicola mit 5 %. Gegen Serovar pomona war kein Serum bei einer Verdünnungsstufe von 1:100 oder höher positiv.

Abbildung 7: Verteilung der positiven Reagenten ($MAR \geq 1:100$) nach Serovaren



Betrachtet man die Häufigkeit und Prävalenz aller positiven Serumproben der einzelnen Serovare zu allen untersuchten Seren, so reagierten 36 Seren (1,04 %) gegen Serovar hardjo, drei Seren (0,09 %) gegen Serovar canicola, 26 Seren (0,75 %) gegen Serovar grippotyphosa, acht Seren (0,23 %) gegen Serovar icterohaemorrhagiae, keine Seren gegen Serovar pomona und fünf Seren (0,14 %) gegen Serovar bratislava. Das Konfidenzintervall der einzelnen Serovare für bayerische Rinder in der Altersgruppe von 6 bis 24 Monaten wurde ebenfalls durch die Binomialverteilung bestimmt und ist in Tabelle 4 zu sehen.

Tabelle 4: Häufigkeit, Prävalenz und Konfidenzintervall der einzelnen Serovare aller Reagenten

	Hardjo	Canicola	Grippot.	Icteroha.	Pomona	Bratislava
Häufigkeit	36	3	26	8	0	5
Prävalenz	1,04 %	0,09 %	0,75 %	0,23 %	0	0,14 %
unterer Wert*	0,8 %	0,04 %	0,56 %	0,16 %	0	0,04 %
oberer Wert*	1,37 %	0,22 %	1,03 %	0,45 %	0,09 %	0,22 %

*Bei einem Vertrauensbereich von 95%; Binomialverteilung.

Die *Leptospira*-Antikörper positiven Proben stammen aus 41 verschiedenen Betrieben. Bei 13 dieser Betriebe waren zwei oder drei Seren positiv. Bei zwölf dieser Betriebe war Serovar hardjo für mehr als eine Probe positiv, meist auch mit höheren Titern. In Tabelle 5 sind Serovar, Höhe des Titers und Vorkommen pro Betrieb angegeben.

Tabelle 5: Verteilung der Serovare und Höhe der Titer bei Betrieben mit mehreren positiven Seren

Betrieb	MAR-Titer für Serovar hardjo	MAR-Titer für Serovar icterohaemorrhagiae	MAR-Titer für Serovar grippotyphosa
1	12800, 3200, 1600		
2	800, 100		
3	800, 100		
4	1600, 400		
5	800, 100		
6	800, 400		
7	6400, 3200, 1600		
8	3200, 400, 100		
9	1600, 800, 100		
10	800, 400	400	
11	800, 400, 100		
12	6400, 200	100	
13		100	100

Eine Unterscheidung der Häufigkeit und Prävalenz der positiven Seren anhand der Anzahl der Milchrinder pro Betrieb ist durch die Einteilung der beprobten Betriebe in Größenklassen möglich. In der Größenklasse 1 wurden neun positive Seren von insgesamt 598 beprobten Seren (1,51 %) gefunden. Bei Betrieben der Größenklasse 2 wurden 20 positive Seren in insgesamt 879 beprobten Seren (2,28 %) ermittelt. Bei Betrieben der Größenklasse 3 wurden 21 positive Seren von insgesamt 862 beprobten Seren (2,44 %) und bei Betrieben der Größenklasse 4 wurden elf positive Seren (1,23 %) von insgesamt 891 beprobten Seren gefunden. Das Konfidenzintervall für die jeweilige Größenklasse ist in Tabelle 6 angegeben. Vergleicht man die Prävalenzen der jeweiligen Betriebsgrößenklasse mit allen übrigen Betrieben mittels CHI^2 -Test, so ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 6: Größenklasse, Anzahl der Milchkühe der Klasse, gesamte Anzahl der untersuchten Seren, Häufigkeit und Prävalenz der positiven Seren je Größenklasse und Konfidenzintervall

Klasse	Milchkühe	Seren	Häufigkeit	Prävalenz	unterer Wert*	oberer Wert*	p CH^2 Test
1	1-19	598	9	1,51 %	0,9 %	2,60 %	0,55
2	20–29	879	20	2,28 %	1,62 %	3,28 %	0,40
3	30–49	862	21	2,44 %	1,75 %	3,48 %	0,22
4	> 50	891	11	1,23 %	0,78 %	2,02 %	0,12

*Bei einem Vertrauensbereich von 95 %, Binomialverteilung.

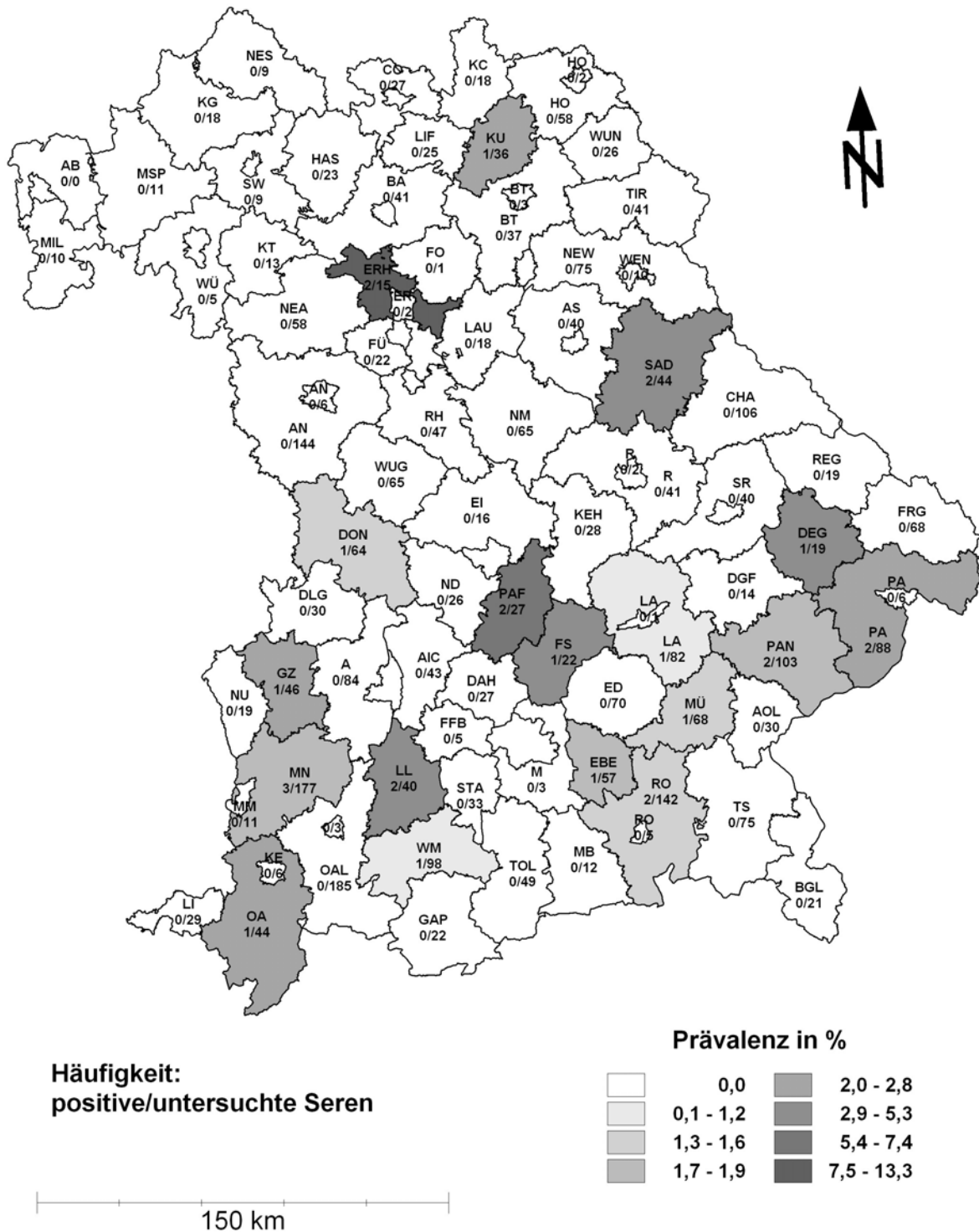
4.2.2 Regionale Verteilung der Reagenten in Bayern

Die regionale Unterteilung aller positiven Seren der getesteten Jungrinder in Bayern wurde auf der Ebene der Landkreise vorgenommen. Bei der Betrachtung der regionalen Verteilung der positiven Reaktionen ist ein Unterschied zwischen dem Serovar hardjo und den anderen untersuchten Serovaren festzustellen.

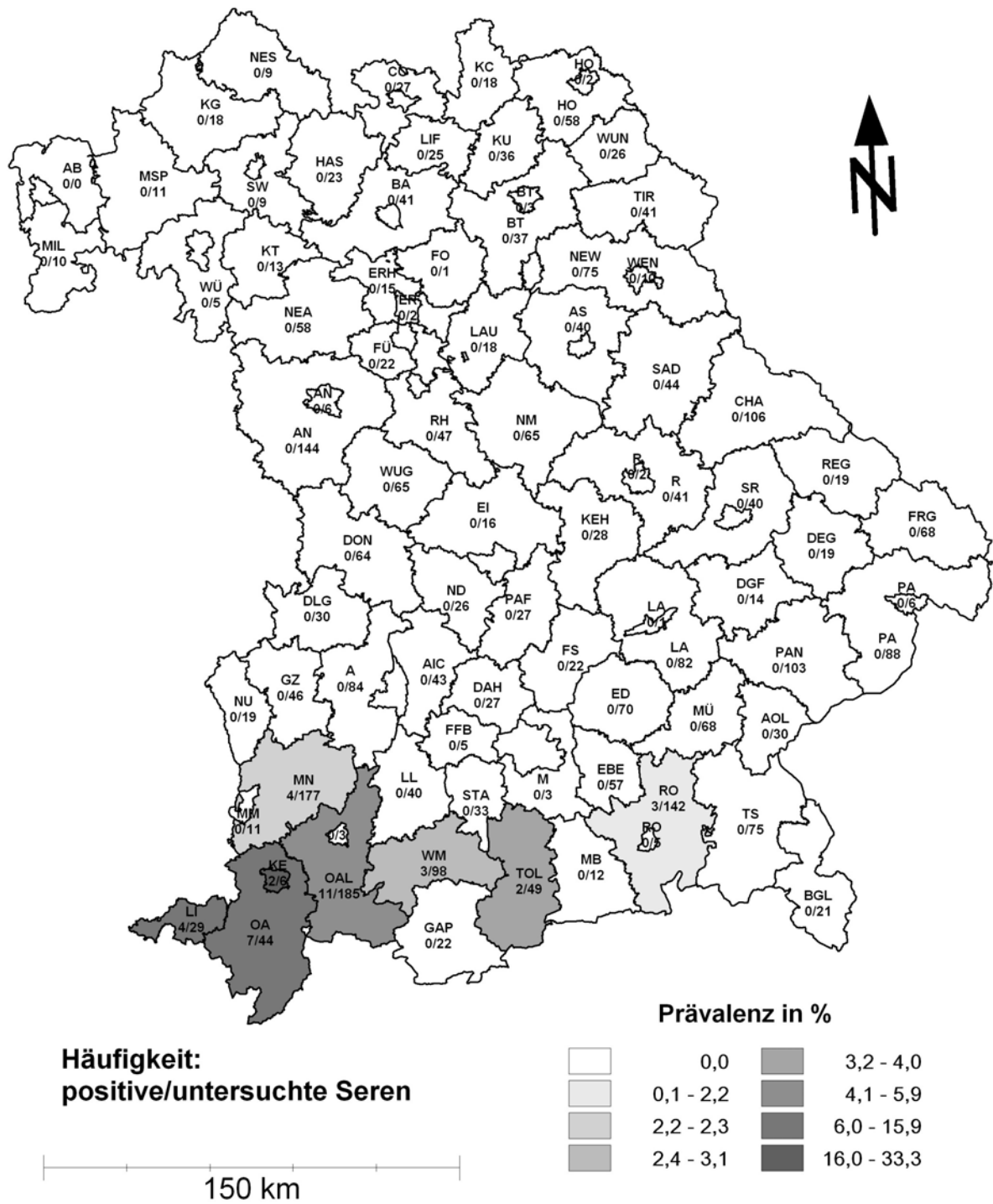
Das Vorkommen der Serovare canicola, grippotyphosa, icterohaemorrhagiae, pomona und bratislava lässt keine regionale Häufung erkennen und die Verteilung erscheint flächendeckend gleich, soweit dies die geringe Anzahl an Reagenten erkennen lässt. Die Häufigkeit dieser Serovare wird in der Abbildung von Karte 1 zusammenfassend dargestellt.

Die Verteilung der positiv bewerteten Seren von Serovar hardjo zeigt dagegen eine Anhäufung. Betroffen sind die acht Landkreise Bad Tölz-Wolfratshausen, Kempten/Allgäu, Lindau/Bodensee, Oberallgäu, Ostallgäu, Rosenheim, Unterallgäu und Weilheim-Schongau. Diese Landkreise liegen alle im Süden von Bayern, im Bereich der Alpen bzw. im südlichen Voralpenland. Am relativ häufigsten konnte Serovar hardjo im Stadtgebiet von Kempten bei zwei der sechs untersuchten Seren festgestellt werden. Des Weiteren folgten in der Häufigkeit der Landkreis Oberallgäu mit sieben positiven von insgesamt 44 untersuchten Seren (16 %), der Landkreis Lindau/Bodensee mit vier positiven von insgesamt 29 untersuchten Seren (14 %) und der Landkreis Ostallgäu mit elf positiven von insgesamt 185 untersuchten Seren (6 %). Diese genannten Landkreise befinden sich alle, wie auch aus Karte 2 zu entnehmen ist, in der Region Allgäu.

Karte 1: Prävalenz und Anzahl der positiven Seren im Vergleich zu den untersuchten Seren, aufgeteilt in die einzelnen Landkreise von Bayern für Serovar canicola, grippotyphosa, icterohaemorrhagiae, pomona und bratislava.
(erstellt mit RegioGraph 8)



Karte 2: Prävalenz und Anzahl der positiven Seren im Vergleich zu den untersuchten Seren, aufgeteilt in die einzelnen Landkreise von Bayern für Serovar hardjo. (erstellt mit RegioGraph 8)



4.2.3 Prävalenz von Herden mit Reagenten

Reagenten gegen die Serovare icterohaemorrhagiae, grippotyphosa, canicola, pomona und bratislava wurden in 24 (1,98 %) bayerischen Herden gefunden. Untersucht wurden 1213 Herden, daraus errechnet sich mithilfe der Binominalverteilung eine Herdenprävalenz zwischen 1,45 % und 2,76 %, bei einem Vertrauensbereich von 95 %.

Eine Aussage zur Herdenprävalenz für ganz Bayern ist aufgrund der regionalen Konzentration (siehe Karte 2) bei Serovar hardjo nicht sinnvoll. Hardjo-Reagenten traten nur in den südlichen Landkreisen auf. Fasst man die Landkreise der Alpen und Voralpenregion zusammen (Kempten, Memmingen, Lindau, Unterallgäu, Oberallgäu, Ostallgäu, Weilheim, Garmisch-Partenkirchen, Bad Tölz, Miesbach, Rosenheim, Traunstein und Berchtesgadener Land), ergeben sich 307 Betriebe, die beprobt wurden. Davon hatten 18 Betriebe (5,86 %) Reagenten gegen Serovar hardjo. Das Konfidenzintervall für die Prävalenz in diesen Landkreisen liegt bei 4,10 % und 8,56 % bei einem Vertrauensbereich von 95 %. Bei den übrigen bayerischen Landkreisen (n = 906 Herden) wurden keine Reagenten gefunden, die Prävalenz liegt damit unter 0,33 % bei 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit.

4.2.4 Datenanalysen anhand des Fragebogens in Bezug auf serologisch positive Betriebe

Die Fragebögen der einzelnen Betriebe wurden zunächst mit dem serologischen Ergebnis des Betriebes in Bezug gesetzt. Als serologisch positiv wurde ein Betrieb betrachtet, wenn in der Stichprobe mindestens ein Tier mit der MAR positiv ($> 1:50$) getestet wurde. Da Serovar hardjo zu enzootischen Infektionen in Rinderherden führt, wurden die Hardjo-Antikörper-positiven Herden separat gruppiert, während Herden mit Reagenten für andere Serovare (canicola, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa, pomona und bratislava) zusammengefasst wurden. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, weil bei letzteren nur sporadische Infektionen von Einzeltieren zu Grunde liegen dürften (siehe Literaturübersicht, Kapitel 2.3.2.). Insgesamt konnte weder für Hardjo-positive Betriebe noch für Betriebe, die mit den anderen Serovaren reagierten, ein signifikanter Unterschied gegenüber den jeweiligen negativen Herden gefunden werden. In Tabelle 7 sind die Vergleiche von Hardjo-positiven Herden zu den negativen Herden für die Angaben zur Herdengröße, Milchleistung und Reproduktion zu finden.

Tabelle 7: Angaben zu Herdengröße, Milchleistung und Reproduktion in den 18 Herden mit Serovar-hardjo-spezifischen Antikörpern in der Stichprobe im Vergleich zu den 1195 übrigen Herden, ausgenommen Herden mit Reagenten gegen andere Serovare.

Merkmale	Hardjo-Reagenten vorhanden (18 Herden)		keine Reagenten vorhanden (1195 Herden)		Vergleich der beiden Gruppen		
	Mittelwert	STD*	Mittelwert	STD	Differenz**	Signifikanz	p (Student t-Test)
Gesamtanzahl der Rinder	64,7	34,8	77,8	52,7	-13,1	n.s.***	0,31
Anzahl Kühe	30,4	15,3	34,1	21,3	-3,2	n.s.	0,54
Erstbesamungserfolg	53,6 %	17,4 %	60,1 %	16,2 %	-6,5 %	n.s.	0,11
Güstzeit (Tage)	82,4	22,7	79,8	28,8	2,6	n.s.	0,73
Milchleistung kg (Herdendurchschnitt)	6801	1247	6237	1255	564	n.s.	0,07

* STD: Standardabweichung

** Differenz des Wertes (betroffene Herden) – (nicht betroffene Herden)

*** n.s. = nicht signifikant $p > 0,05$ (Student-t-Verteilung)

Der Erstbesamungserfolg lag bei den Herden mit Hardjo-Reagenten bei 53,6 % (Standardabweichung 17,4 %) und damit um 6,5 % niedriger als bei den übrigen Herden. Der Unterschied ist nicht signifikant bei einem p von 0,11 (Student t-test). Das Merkmal Güstzeit ist mit dem Erstbesamungserfolg verbunden. Tendenziell war die Güstzeit bei den betroffenen Herden etwas höher (2,6 Tage). Die weiteren Reproduktionsdaten im Fragebogen wurden nicht ausgewertet, da die Angaben hierzu nur lückenhaft und zum Teil inplausibel waren.

Im Gegensatz zu den tendenziell schlechteren Ergebnissen bei den Reproduktionsdaten lag der gleitende Herdendurchschnitt der Milchleistung bei den Hardjo-betroffenen Herden mit 6801 kg um 564 kg höher als bei der Vergleichsgruppe (nicht signifikant, $p = 0,11$). Die Auswertung der Fragebögen zur angegebenen Rasse für diese Betriebe ergab, dass 13 der 18 Herden reine Braunviehherden waren und vier weitere Herden Mischherden mit Braun- und Fleckvieh bzw. Schwarzbunte. Der gleitende Herdendurchschnitt bei allen Braunviehherden ($n = 79$) lag bei 6652 kg und bei allen Schwarzbunt-Herden ($n = 18$) bei 7905 kg. Die Abhängigkeit der Milchleistung von der Rasse dürfte hier im Vordergrund stehen.

Angaben zur Herdengröße, Milchleistung und Reproduktion bei Herden, die serologisch positive Tiere gegen die Serovare canicola, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa, oder bratislava aufwiesen, ließen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede erkennen. Die Daten sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8: Angaben zu Herdengröße, Milchleistung und Reproduktion in den 18 Herden mit Leptospira-spezifischen Antikörpern gegen die Serovare grippotyphosa, icterohaemorrhagiae, bratislava oder canicola in der Stichprobe im Vergleich zu den 1191 übrigen Herden, ausgenommen Herden mit Serovar-hardjo-Reagenten.

Merkmale	Reagenten vorhanden (21 Herden)		keine Reagenten vorhanden (1191 Herden)		Vergleich der beiden Gruppen		
	Mittelwert	STD*	Mittelwert	STD	Differenz**	Signifikanz	p (Student t-Test)
Gesamtanzahl der Rinder	71,24	55,4	77,7	52,5	-6,5	n.s.***	0,58
Anzahl Kühe	36,0	23,9	34,1	21,1	2,0	n.s.	0,72
Erstbesamungserfolg	61,5 %	15,8 %	60,0 %	16,2 %	1,5 %	n.s.	0,73
Güstzeit (Tage)	67,6	12,4	79,9	28,8	-12,3	n.s.	0,16
Milchleistung kg (Herdendurchschnitt)	6742	1426	6244	1239	498	n.s.	0,11

* STD: Standardabweichung

** Differenz des Wertes (betroffene Herden) – (nicht betroffene Herden)

*** n.s. = nicht signifikant $p > 0,05$ (Student-t-Verteilung)

Angaben zur räumlichen Trennung von Mastrindern und von Kühen und Nachzucht wurden bei den Hardjo-positiven Herden und den Herden, die serologisch positiv mit den anderen Serovaren reagierten (Serovar canicola, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa, und bratislava), mit den jeweiligen negativen Herden verglichen. Dabei konnten keine Unterschiede beobachtet werden.

Bei 14 von 18 Herden, die mittels MAR in der Stichprobe positiv für Serovar hardjo getestet wurden, wurde angegeben, dass Rinder als Pensionsvieh (Sammelweiden, Alpen usw.) abgegeben werden. Bei den negativ getesteten Betrieben wurde diese Angabe bei 65 von insgesamt 1130 erbracht. Der Unterschied ist „höchst signifikant“ ($p < 1,95^{-14}$, Fisher's Exact Test).

Ein Vergleich des Merkmals „Abgabe von Pensionsvieh“ von positiv (0 von 21) und negativ (78 von 1113) getesteten Herden für die Serovare canicola, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa und bratislava ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,39$).

Die Erkrankungshäufigkeiten wurden beim Vergleich von Hardjo-positiven Herden zu den negativen Herden ausgewertet. Für die Herden mit Reagenten zu anderen Serovaren wurde die Auswirkung von Erkrankungsanhäufungen nicht dargestellt, da die Stichprobenzahl ein zuverlässiges Auffinden von Herden mit sporadischen Einzelinfektionen nicht erlaubt und die Gruppenbildung in betroffene und nicht betroffene Herden einen zu großen Fehler bedingen würde. Auch waren hier Unterschiede bei den 21 Herden zu den übrigen Herden nicht festzustellen.

Für die Vierfeldertafeln wurden die Angaben „Krankheitserscheinung“ tritt gelegentlich (++) oder häufig (+++) auf zusammengefasst und mit positiv definiert. Die Angabe „Krankheitserscheinung“ tritt selten (+) auf und keine Angabe zu diesem Punkt wurde als negativ gesetzt. Zur Ermittlung von Unterschieden zwischen Betrieben, die in der Stichprobe positiv für Serovar hardjo (MAR) getestet wurden und negativen Betrieben wurde für jedes Krankheitsmerkmal die Signifikanz im Fisher's Exact Test geprüft. In Tabelle 9 sind die Häufigkeit der positiv und negativ gegen Serovar hardjo reagierenden Herden, die Differenz in Prozent und eine Aussage zur Signifikanz aufgeführt. Bei allen Krankheitserscheinungen konnte keine signifikante Aussage bei Vergleich der beiden Gruppen ermittelt werden.

Tabelle 9: Angaben zu Erkrankungshäufigkeiten in den 18 Herden mit Serovar-hardjo-spezifischen Antikörpern in der Stichprobe im Vergleich zu den 1195 übrigen Herden, ausgenommen Herden mit Reagenten gegen andere Serovare.

Merkmale	Hardjo-Reagenten vorhanden (18 Herden)		keine Reagenten vorhanden (1195 Herden)		Vergleich der beiden Gruppen		
	Herden mit vermehrt Symptomen*	Anteil	Herden mit vermehrt Symptomen	Anteil	Differenz**	Signifi- kanz	p (Fisher's Exact Test)
Aborte	3	17 %	128	11 %	6 %	n.s.***	0,43
Umrindern	9	50 %	581	49 %	1 %	n.s.	1,00
unregelmäßige Brunst	5	28 %	311	26 %	2 %	n.s.	0,79
Vaginalausfluss	3	17 %	212	18 %	-1 %	n.s.	n.d.
Missbildungen	1	6 %	31	3 %	3 %	n.s.	0,38
Grippe	4	22 %	269	23 %	0 %	n.s.	1,00
Durchfall	6	33 %	317	27 %	7 %	n.s.	0,59
hämorrhagische Erkrankungen	0	0 %	37	3 %	-3 %	n.s.	1,0
Klauenprobleme	5	28 %	185	15 %	12 %	n.s.	0,18
Mastitiden	5	28 %	293	25 %	3 %	n.s.	0,78
Tod	1	6 %	90	8 %	-2 %	n.s.	1,0

* Anzahl der Herden, bei denen der Betriebsleiter vermehrtes Auftreten des Krankheitsmerkmals als gelegentlich (++) oder häufig (+++) angegeben hat

** Differenz des %-Anteils: (betroffene Herden) – (nicht betroffene Herden)

*** n.s. = nicht signifikant $p > 0,05$ (Fisher's-Exact-Verteilung)

4.3 Ergebnisse von Leptospiren-Nachweisen in Feten und der korrespondierenden Serologie in dem Betrieb

4.3.1 Ergebnisse zur Sensitivität der Leptospiren-PCR und Vergleich von Extraktionsmethoden

Mithilfe der PCR konnte bei beiden Extraktionsverfahren, Proteinase K/Phenol und QIAamp® DNA Mini Kit (Quiagen GmbH, Hilden), Leptospirengenom nachgewiesen werden. Sowohl bei der Probe mit Labmageninhalt von einem Fetus aus einem gesunden Schlachttier als auch bei der Kontrolle ohne Organmaterial (A. bidest.) konnte keine Leptospiren-DNS nachgewiesen werden.

Ausgehend von der gezählten Anzahl Leptospiren im Extraktionsansatz wurde für die jeweilige Verdünnungsstufe die Anzahl der Leptospiren pro PCR-Ansatz errechnet. Für beide Extraktionsmethoden waren rein rechnerisch weniger als eine gezählte Leptospire nachweisbar mit einem C_t -Wert von 36,9 (Phenol/Proteinase-K-Extraktion) und 35,6 (QIAamp® DNA Mini Kit). Bei allen Amplifikaten ergab die Analyse der Sonden-Schmelzpunkte den typischen spezifischen Kurvenverlauf. Die mittlere Schmelztemperatur lag bei 61,41 °C und entspricht dem Erwartungswert von 61-62 °C für die gewählten Gensonden. Ein Vergleich der C_t -Werte der beiden Extraktionsverfahren ist in Tabelle 10 aufgeführt. Der Anstieg der Fluoreszenzwerte in Abhängigkeit von der Zykluszahl ist für die verschiedenen Verdünnungsstufen für ein Experiment in Abbildung 7 dargestellt. Für die jeweils parallel durchgeführten Extraktionen pro Methode und Verdünnungsstufe wurden die C_t -Werte zu einem Mittelwert zusammengefasst und verglichen. Bei den log10-Verdünnungsreihen errechnete sich ein mittlerer Anstieg des C_t -Wertes von 3,09 bei einer Standardabweichung von 0,73. Der erwartete Anstieg von ungefähr 3,3 Zyklen bei jeweils einem Zehntel an spezifischer DNA wurde damit annähernd erreicht.

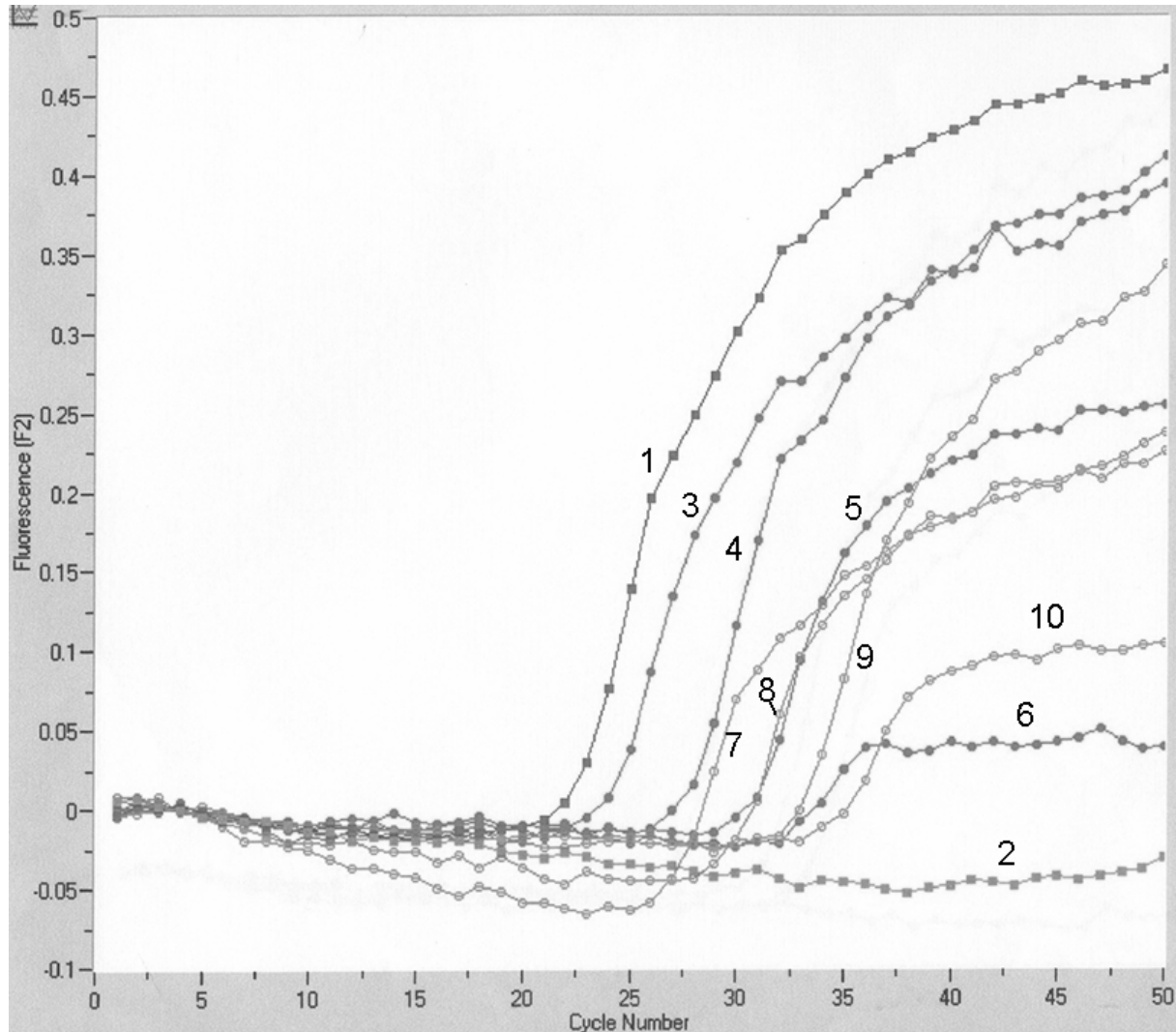
Tabelle 10: Vergleich der Leptospira-DNS-Extraktionsmethoden Proteinase K/Phenol und QIAamp® DNA Mini Kit.

Proteinase-K/Phenol-Extraktion			QIAamp®-DNA-Mini-Kit-Extraktion		
C _T -Werte (Mittelwert)	Delta C _T - Wert *	<i>Leptospira</i> pro PCR- Ansatz**	C _T -Werte (Mittelwert)	Delta C _T - Wert	<i>Leptospira</i> pro PCR- Ansatz
23,58		1237			
26,47 27,73 26,81 (27,00)	3,42	124	26,28 28,34 (27,31)		309
30,59 30,26 31,78 (30,88)	3,88	12	29,39 29,78 28,46 (29,21)	1,90	31
33,37 33,23 33,24 (33,28)	2,40	1,2	33,17 33,24 32,71 (33,04)	3,83	3,1
36,91	3,63	0,1	35,58	2,54	0,3
>50	--	keine	>50	--	keine

* C_T-Wert der Verdünnungsstufe minus C_T-Wert der vorherigen Verdünnungsstufe (log10)

** Die zugefügten Leptospiren wurden im Dunkelfeldmikroskop gezählt, angegeben ist die rechnerische Anzahl von Leptospiren im jeweiligen PCR-Ansatz, die Verdünnungsreihen wurden in PBS hergestellt

Abbildung 7: Ergebnisse eines Einzelexperimentes der *Real-time-PCR* zur Bestimmung der Sensitivität und Vergleich zweier Extraktionsmethoden (Ausdruck Light-Cycler-Data Analysis)



1 Positivkontrolle: DNA aus Leptospirenkultur (Serovar hardjo) ohne Labmageninhalt

2 Negativkontrolle: *A. bidest.*

3 bis 6: Phenol/Proteinase-K-Extraktion aus Labmageninhalt mit Leptospiren mit X Bakterien im PCR-Ansatz:

3: 1236 L. Hardjo (C_t -Wert: 23,58)

4: 124 L. Hardjo (C_t -Wert: 27,73)

5: 12 L. Hardjo (C_t -Wert: 30,26)

6: 1,2 L. Hardjo (C_t -Wert: 33,23)

7-10: QIAamp®-DNA-Mini-Kit-Extraktion

7: 309 L. Hardjo (C_t -Wert: 28,34)

8: 31 L. Hardjo (C_t -Wert: 28,46)

9: 3 L. Hardjo (C_t -Wert: 32,71)

10: 0,3 L. Hardjo (C_t -Wert: 35,58)

4.3.2 Ergebnisse der Leptospiren-PCR-Untersuchungen aus Feten

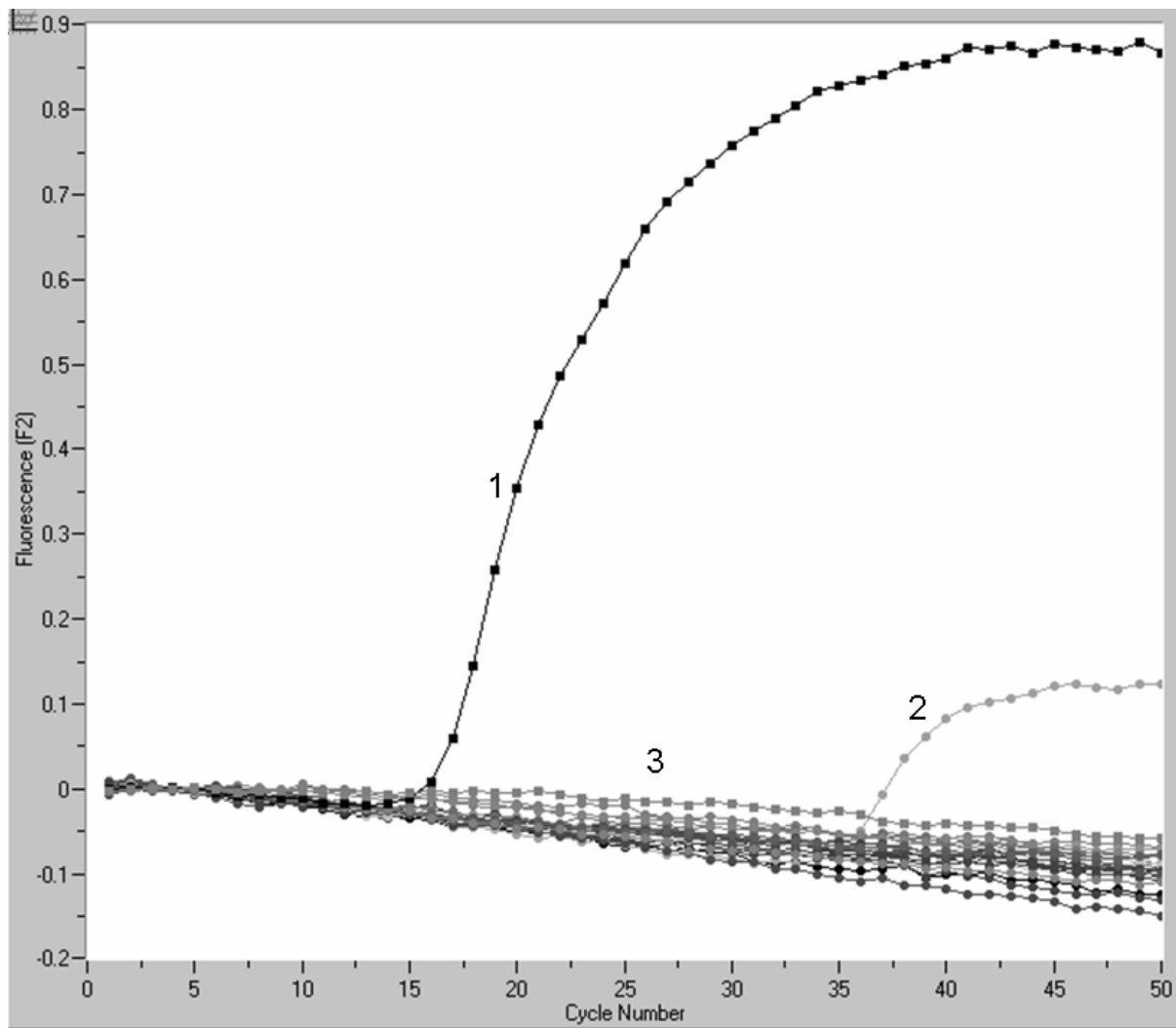
Von den 154 untersuchten Labmageninhalten von abortierten Feten konnte bei einer Probe mittels *Real-time* PCR ein für *Leptospira interrogans* spezifisches DNS-Fragment bei einem C_t -Wert von 36,1 nachgewiesen werden (Abbildung 8). Der Schmelzpunkt der Gensonden lag zwischen 61 °C und 62 °C, vergleichbar mit der mitgeführten Positivkontrolle (Abbildung 9), und ist somit spezifisch für die Leptospiren-PCR.

Der Vergleich mit den Proben der Verdünnungsreihe (Abbildung 7) lässt eine semiquantitative Aussage zur Leptospirenkonzentration zu. In der positiven Probe waren ungefähr 60 Leptospiren pro ml vorhanden (C_t -Wert von 36,1 entspricht ca. 0,3 Leptospiren im PCR-Ansatz mit 5 Mikroliter Ausgangsmaterial Labmageninhalt).

Eine kulturelle Untersuchung von Leptospiren aus der PCR-positiven Labmageninhaltsprobe blieb negativ.

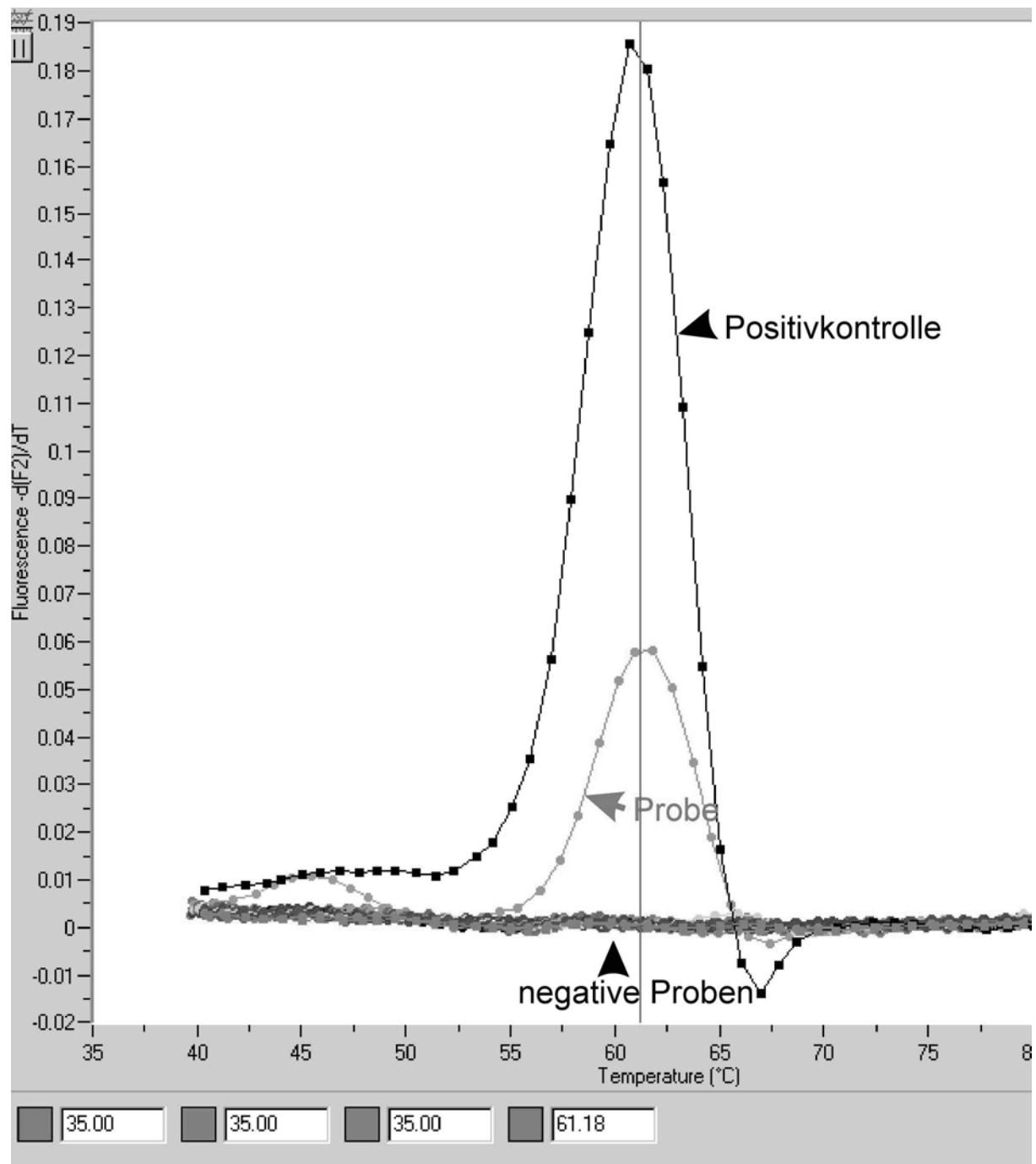
Die relative Häufigkeit positiver Proben bei den untersuchten Labmagenproben errechnet sich mit 0,65 % bei einem Konfidenzintervall von 0,23 %-3,04 % (Binomialverteilung, Vertrauensbereich 95 %).

Abbildung 8: Fluoreszenzwerte in Abhängigkeit zu den Zyklen für die positive Probe



- 1 Positivkontrolle (C_t -Wert: 15,8), DNA aus Leptospirenkultur (Serovar hardjo)
- 2 Positive Probe aus Labmageninhalt (C_t -Wert: 36,1)
- 3 Negativkontrolle (*A. bidest.*) und negative Proben

Abbildung 9: Schmelzpunktkurve für die positive Labmagenprobe



4.3.3 Antikörpernachweis im Herzblut der abortierten Feten

Von den 57 untersuchten fetalen Herzblutproben konnten bei 56 keine Antikörper in der MAR (<1:5) gegen die untersuchten *Leptospiren*serovare festgestellt werden. Eine Probe zeigte eine positive Reaktion gegen Serovar canicola bei einer Serumverdünnung von 1:25. Das PCR-Ergebnis der Labmagenuntersuchung dieses Fetus blieb negativ. Weitere Seren von der Mutter oder von anderen Rindern des Bestandes standen nicht zur Verfügung.

Bei der serologischen Untersuchung des Herzblutes des Fetus, dessen Labmageninhalt PCR-Nachweis positiv reagierte, konnten keine Antikörper nachgewiesen werden.

4.3.4 Antikörpernachweis in Proben der Herden mit *Leptospira*-PCR-untersuchten Feten

Von 55 serologisch untersuchten Serumproben, die bereits initial mit den Feten eingesandt wurden, reagierten fünf Proben aus vier Betrieben positiv. Die dazugehörigen Labmagenproben waren bei allen vier Fällen in der *Leptospira*-PCR negativ. Die serologische Herzblutuntersuchung des Fetus war jeweils negativ. Die Höhe der nachgewiesenen Antikörpertiter und das zu Grunde liegende Serovar sind aus Tabelle 11 ersichtlich.

Tabelle 11: Antikörpertiter und das reagierende Serovar der zur Abortdiagnostik mitgesandten Seren (n = 55 aus 32 Betrieben)

Fall	Serum 1	Serum 2	PCR-Fetus	MAR-Fetus
1	Hardjo 1:1600		negativ	< 1:5
2	Grippot. 1:100		negativ	< 1:5
3	Hardjo 1:3200		negativ	< 1:5
4	Hardjo 1:3200	Hardjo 1:800	negativ	< 1:5

Nach Aufforderung wurden 104 Seren aus 15 Betrieben zur serologischen Untersuchung der Leptospirose eingesandt. Von diesen Blutseren konnten bei sechs Rindern aus sechs verschiedenen Beständen Antikörper mit Titerstufen über 1:100 nachgewiesen werden. Davon waren zwei der positiven Tiere Kühe, von denen ein Fetus zur pathologischen Untersuchung eingeschickt wurde, zwei der positiven Tiere waren ebenfalls Muttertiere, die verworfen hatten aber die Feten nicht zur Untersuchung vorhanden waren und zwei der positiven Tiere waren Jungtiere, die aus einem Bestand mit Abortproblemen stammten.

Aus dem Bestand mit dem PCR-positiven Fetus wurden neben dem Muttertier mehrere Tiere serologisch untersucht. Bei der Untersuchung der Kuh, die den PCR-positiven Fetus abortiert hatte, waren mittels MAR keine Antikörper gegen Leptospiren nachweisbar. Eine wiederholte Untersuchung nach 3 Monaten verlief ebenfalls negativ. Vier weitere Kühe aus der selben Laufstallgruppe und drei Jungtiere waren bei der serologischen Untersuchung ebenfalls negativ. Außerdem standen aus diesem Bestand für die serologische Untersuchung Seren von drei weiteren Muttertieren, die abortiert hatten, zur Verfügung. Von diesen drei Kühen mit einer Abortvorgeschichte war eine Kuh in der MAR positiv. Ihr Serum reagierte mit einer Serumverdünnung von 1:800 gegen Sero var hardjo, von 1:100 gegen Sero var canicola und von 1:100 gegen Sero var grippotyphosa. Weitere Werte zu den serologischen Reagenten sind in der Tabelle 11 aufgeführt.

Zusammengefasst standen aus 47 Betrieben Proben zur weiteren serologischen Diagnostik zur Verfügung, von denen 7 (15 %) einen spezifischen Antikörpertiter (MAR: 1:200–1:3200) gegen Sero var hardjo aufwiesen. Bei drei Betrieben war bereits bei den mit dem Fetus eingesandten Proben ein Reagent gegen Sero var hardjo (Tabelle 11) vorhanden, bei 4 weiteren wurden Reagenten bei den nachgeforderten Seren gefunden (Tabelle 12).

Tabelle 12:

Serovarspezifische Reaktionen der nachträglich eingesendeten Seren, PCR-Ergebnis des Fetus, MAR-Herzblut Ergebnis des Fetus, Aufstallung des Tieres und Beziehung zum untersuchten Fetus.

Bestand	untersuchte Seren im Bestand	Hardjo	Canicola	grippotyphosa	icterohaemorrhagiae	bratislava	Aufstallung	Beziehung zum eingesandten Fetus	PCR-Fetus	MAR-Herzblut des Fetus
1	1	200					keine Angaben	Kuh mit eingesandten Abort ¹	negativ	nicht untersucht
2	1	200					keine Angaben		negativ	nicht untersucht
3	10	3200					Laufstall	weiteres Rind ² mit Abortvorgeschichte	negativ	negativ
4	10	800	100	100			Laufstall		positiv	negativ
5	8					100	Anbindehaltung	Jungtier	negativ	negativ
6	9		800		800		Box	Jungtier	negativ	nicht untersucht

¹ Kuh, deren Fetus zur Diagnostik eingeschickt wurde

² Kuh, die abortiert hat und ebenfalls aus einer Herde stammt, aus der ein Fetus untersucht wurde

5 Besprechung der Ergebnisse

Der Nachweis von Antikörpern gegen Leptospiren ist weniger zeitaufwändig oder kostenintensiv als der Erregernachweis oder andere direkte Nachweismethoden. Epidemiologische Studien mit Massenuntersuchungen zur Bestimmung der Prävalenzen beruhen daher meist auf serologischen Untersuchungen.

Auch in der vorliegenden Studie wurde die Seroprävalenz gemessen. Die Seren stammten von randomisiert gewählten Herden ($n = 1213$) und wurden im Rahmen einer BVD/MD-Prävalenzstudie entnommen. Wegen der spezifischen Biologie des BVD/MD-Virus wurden bei dieser Studie zur Beprobung speziell Rinder im Alter von 6–24 Monaten (Jungtierfenster) ausgewählt.

Diese Altersvorauswahl kann auch für die Serodiagnostik der Leptospirose als geeignet betrachtet werden. Wie im Literaturteil unter 2.3.4 bereits erläutert, ist der Titerverlauf der Antikörper gegen Leptospiren von einigen Faktoren abhängig und die Titerpersistenz variabel. Da der Zeitpunkt der zu Grunde liegenden Infektion bei einem einmaligen Antikörpernachweis unbekannt ist, kann bei älteren Tieren keine Aussage darüber gemacht werden, ob diese Infektion mit einer aktuellen Herdeninfektion in Verbindung steht oder ob es sich um ein älteres Infektionsgeschehen handelt und aktuell keine Leptospireninfektionen in der Herde vorkommen. Außerdem wirken die bereits vorhandenen Antikörper älterer Tiere immunologisch protektiv. Eine erneute Infektion hat in solchen Fällen nur geringe oder gar keine klinischen Folgen, lediglich würden sekundäre Immunreaktionen zu kurzfristigen Titeranstiegen führen (HATHAWAY et al. 1986). Insgesamt gesehen ist die Interpretation für das aktuelle Infektionsgeschehen in der Population anhand von serologischen Befunden älterer Tiere deshalb mit Vorbehalt zu betrachten. Eine Serodiagnostik bei jungen Tieren hat mehrere Vorteile für die Interpretation der Befunde. Zum einen kann der Zeitpunkt der Infektion aufgrund des limitierenden zeitlichen Rahmens der Probenentnahme auf maximal zwei Jahre (Jungtierfenster) eingeschränkt werden, zum anderen bilden Jungtiere nach einer Infektion zuverlässig Antikörper. Bei einem Vergleich von Jungrindern und älteren Kühen stellte Ellis für die Gruppe der jüngeren Kühe eine viel höhere Inzidenz fest und folgerte daraus, dass jüngere Rinder eine besonders wichtige Rolle für die Epidemiologie der Infektion spielen (ELLIS et al. 1981). Diese Aussage gilt vor allem für Infektionen mit Serovar hardjo, da hier das Rind Hauptwirt ist. Rinder infizieren sich bei betroffenen Herden in der Regel in einem frühen Alter (LEVETT 2001). Persistent infizierte Rinder, die Leptospiren dauernd oder intermittierend ausscheiden, können selbst in der serologischen Untersuchung unauffällig bleiben. Diese persistent infizierten Rinder sorgen für eine Durchseuchung ihrer Herden. Solch eine Diskrepanz zwischen einem direkten Erregernachweis durch Isolierung und dem indirekten Nachweis wurde vor allem bei älteren Tieren festgestellt (ELLIS et al.

1986). Einen hohen Grad der Durchseuchung bei Jungrindern konnte Durfee (1980) bei 22 seronegativen Kalbinnen, die in eine mit Serovar hardjo infizierte Herde verbracht wurden, feststellen. Nach wiederholten serologischen Untersuchungen waren 21 (95 %) dieser Tiere serokonvertiert. Aufgrund dieser hohen Inzidenz von Serovar-hardjo-Infektionen bei Jungrindern innerhalb der Herde wurden in der vorliegenden Studie drei Serumproben im Jungtierfenster je Herde als ausreichend betrachtet, um den Infektionsstatus der Herde feststellen zu können. Bei einem hypothetischen Wert von nur 60 % Seroreagenten unter Jungrindern in enzootisch Serovar-hardjo-infizierten Herden errechnet sich die Treffersicherheit des gewählten Verfahrens folgendermaßen: Das beprobte Jungrind ist mit 40 % Wahrscheinlichkeit seronegativ, bei drei untersuchten Rindern pro Herde ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von 96 % ($1 - 0,4^3 = 0,94$) mindestens einen seropositiven Probanden zu finden. Für die Leptospiren-Serovare, die nicht enzootisch bei Rindern vorkommen, ist das gewählte Stichprobenverfahren als sehr unsicher bezüglich einer Aussage zur gesamten Herde zu betrachten. Nach Literaturangaben kommen diese Infektionen beim Rind nur sporadisch und ohne Tendenz zur Ausbreitung vor (THIERMANN 1984). Bei einer Annahme von 10 % infizierten Jungrindern in einer betroffenen Herde liegt die Trefferdichte dann nur bei 27 %.

Für epidemiologische Fragen wird neben den anderen verfügbaren serologischen Methoden, wie z. B. ELISA, häufig die Mikroagglutinations-Reaktion verwendet. Diese Methode ist aufgrund der mikroskopischen Bewertung der Reaktion personalintensiv. Im Vergleich zu den anderen Methoden ist sie jedoch sehr sensitiv und für die serovarspezifische Typisierung von Antikörpern die Standardmethode.

Der Forderung mancher Autoren nach maximaler Sensitivität des Testes, d. h. einer geringen Anfangsverdünnung des Reaktionsansatzes, steht eine geringere Spezifität gegenüber. Positive Reaktionen sind bei einer Seroverdünnung von 1:10 nachzuweisen und können auch noch eine immunologische Wirkung haben. Die Abgrenzung der positiven Reaktionen gegenüber unspezifischen Reaktionen ist aber sehr schwierig bzw. teilweise unmöglich.

Die Untersuchungen zu dieser Studie wurden mit einer Anfangsverdünnung des Serums von 1:50 durchgeführt und Agglutinationen ab einer Serumverdünnung von 1:100 als positiv bewertet. Ein Großteil der aktuellen Literatur empfiehlt diese Vorgehensweise (FAINE 1982; HEATH u. JOHNSON 1994; TERPSTRA 2003). Einige Autoren stellen jedoch den gewonnenen Vorteil einer höheren Sensitivität durch Verwendung eines geringer verdünnten Reaktionsansatzes von 1:10 über den Nachteil der mangelnden Spezifität (BREM 2003; ELLIS 1984).

Eigene Voruntersuchungen mit einer Anfangsverdünnung von 1:25 erbrachten bei vielen Seren positive Reaktionen. Allerdings wurde aufgrund des diffusen atypischen Agglutinationsverhaltens vermutet, dass diese unspezifisch sind. Bei einer Wiederholung des Testes ergaben sich häufig auch negative Ergebnisse. Deutlich verringert wurde die Anzahl dieser zweifelhaften positiven Agglutinationen durch die Verwendung einer Anfangsverdünnung von 1:50. Darum wurde für die gesamte Untersuchung eine Anfangsverdünnung von 1:50 gewählt. Um eine auch allgemein akzeptierte Spezifität zu erhalten, wurden Seren mit Agglutinationen ab einer Seroverdünnung von 1:100 als positiv bewertet (ELLIS et al. 1986). Im Manual der WHO (Terpstra 2003) wird diese Grundverdünnung ebenfalls empfohlen.

Die Aufteilung der positiven Seren nach dem zu Grunde liegenden Serovar wird von dem Serovar hardjo in der vorliegenden Studie klar dominiert. Aufgrund dieses Ergebnisses und vor allem wegen des unterschiedlichen Wirtsverhaltens werden die Ergebnisse von Serovar hardjo später gesondert besprochen.

Die restlichen Serovare grippotyphosa, icterohaemorrhagiae, canicola und bratislava machen zusammen nur 45 % der positiven Seren aus. Insgesamt stellen die vier Serovare 28 positive Reaktionen bei den 3463 untersuchten Seren. Das ergibt eine Prävalenz dieser Serovare von 0,81 %. Gegen Serovar pomona reagierten nur zwei Seren bei einer Verdünnungsstufe von 1:50 und wurden deshalb als negativ bewertet. Der geringere Anteil dieser Serovare steht im Einklang mit der Tatsache, dass sich das Rind als Nebenwirt an einem Hauptwirt infiziert. Sind dabei im betroffenen Betrieb nicht besondere Faktoren vorhanden, die eine Infektion begünstigen, so scheint die Leptospirose vom Charakter her eine Einzelinfektion zu sein, die nur sporadisch auftritt. Als Risikofaktoren kommen neben einer erhöhten Anzahl von Schädigern im Umfeld der Rinder mangelnde Futterhygiene oder feuchte Lebensbedingungen in Frage. Aber auch an andere Tiere, z. B. Hunde oder Schweine, die Leptospiren ausscheiden und Kontakt zu den Rindern haben, ist zu denken. Das sporadische Auftreten von *Leptospira*-Infektionen mit Serovaren, bei dem das Rind Nebenwirt ist, wird auch in dieser Studie bestätigt. Ein Nachweis von Leptospirenantikörpern bei zwei Tieren pro Herde konnte mit den Serovaren grippotyphosa, icterohaemorrhagiae, canicola und bratislava nur in zwei Betrieben geführt werden. Die anderen 22 Herden hatten jeweils nur einen Seroreagenten gegen diese Serovare. Betrachtet man in Abbildung 6 die Verteilung der Höhe der Titer für die Serovare grippotyphosa, icterohaemorrhagiae, canicola und bratislava so fällt auf, dass die Mehrzahl bei einer Verdünnung von $\leq 1:100$ liegt. Werte im Bereich von 1:100 sind grenzwertig und sprechen nicht für eine aktuelle Infektion,

sondern eher für ein Geschehen, das schon weiter zurückliegt. Eine frische Infektion, bei der die Titerkurve ansteigt, ist hier auch denkbar, aber durch das Fehlen von Mehrfachreaktionen mit anderen Serovaren, ist dies unwahrscheinlich. Maternale Antikörper könnten ebenfalls Ursache für diese Reaktionen sein, doch zeigten Untersuchungen diesbezüglich, dass maternale Antikörper bei Kälbern nur bis zu einem Alter von 13 Wochen gefunden wurden (PALIT et al. 1991).

Zwei Reaktionen gegen verschiedene Serovare sind bei zwei der Seren detektiert worden, die bei einer Verdünnung $\geq 1:400$ reagierten. Hier kann entweder eine Doppelinfektion gegen verschiedene Serovare zu Grunde liegen oder es handelt sich um eine paradoxe Reaktion der Frühphase der Infektion.

Starke regionale Unterschiede sind bei Betrachtung der Reagenten mit Serovar grippotyphosa, icterohaemorrhagiae, canicola und bratislava (Karte 1) nicht zu erkennen. Die Verteilung der Fälle bezogen auf die Landkreise scheint eher gleichmäßig zu sein mit etwas geringerem Auftreten im nördlichen Bayern. Ob das leichte Nordgefälle mit dem Einfluss von anderen Faktoren zu tun hat oder einfach daher rührt, dass im nördlichen Bayern eine geringere Rinderdichte vorhanden ist, konnte nicht verifiziert werden.

Bei einer ähnlichen Untersuchung konnte Brem (BREM u. SCHREYER 1988) für die Serovare grippotyphosa, icterohaemorrhagiae und canicola in 349 Seren eine positive Reaktion ab einer Seroverdünnung 1:100 feststellen. Serovar pomona zeigte, wie auch bei dieser Studie, keine Reaktion. Bei 4860 untersuchten Seren ergab sich damals eine Prävalenz von 7,18 %. Da diese Seren im Rahmen der Leukoseüberwachung genommen wurden, handelte es sich hier um Seren ausschließlich älterer Tiere und die Studien sind dadurch nicht direkt vergleichbar. Allerdings kam auch Brem zu dem Ergebnis, dass bei Serovaren, für die das Rind nicht Hauptwirt ist, die Seren meist bei einer Seroverdünnung von $\leq 1:200$ reagierten. Für die regionale Verteilung dieser Seren gibt Brem Nordbayern als Hauptverbreitungsgebiet an und dort speziell den Landkreis Roth mit Serovar grippotyphosa. In dieser Studie reagierte jedoch Serovar grippotyphosa in diesem Landkreis mit keinem einzigen Serum.

Eine Entwicklung der Vorkommenshäufigkeit für das Serovar icterohaemorrhagiae wird von Brem und Schreyer (1988) beschrieben und kann durch die Untersuchungen dieser Studie bestätigt werden: Wojtek (WOJTEK 1966) fand in Südbayern 1966 bei Exportuntersuchungen von Rindern für das Serovar icterohaemorrhagiae eine Prävalenz von 8,50 % (18/211). Brem ermittelte 20 Jahre später eine Prävalenz von 0,86 %. In der vorliegenden Untersuchung konnte wiederum 20 Jahre später eine Prävalenz von 0,26 %

festgestellt werden. Die abnehmende Tendenz ist mit Vorsicht zu interpretieren, da den Studien jeweils anders vorselektierte Proben zu Grunde lagen.

Die relative Häufigkeit der positiven Reaktionen war für das Serovar hardjo am höchsten (55 %). Vergleichbare Ergebnisse erzielte Brem 1984 mit seinen Untersuchungen. Eine Konzentration der Reagenten mit der Sejro-Gruppe im südlichen Oberbayern und Schwaben mit Titern von meist $\geq 1:400$ wurde auch damals festgestellt. Für Nordbayern konnte Brem 17 positive Seren der Sejro-Gruppe feststellen, für Südbayern 198 ($n = 4860$). Im Rahmen dieser Untersuchung wurde dabei ein Betrieb in Mittelfranken bekannt, bei dem 75 % aller Rinder Antikörper gegen die Serogruppe Sejro besaßen und dessen Jungtiere zur Sömmerung im Allgäu waren (BREM u. SCHREYER 1988). Der Hauptgrund dafür ist wohl, dass Serovar hardjo an das Rind als Hauptwirt adaptiert ist. Rinder sind zwar hoch empfänglich für eine Hardjo-Infektion, aber die Pathogenität für den Wirtsorganismus ist eher gering. Eine lang anhaltende Ausscheidung chronisch infizierter Rinder begünstigt eine natürliche Übertragung innerhalb der Wirtsspezies (LITTLE 1986). Aus diesem Grund sind auch in der vorliegenden Untersuchung bei Serovar hardjo, im Gegensatz zu den anderen Serovaren, meistens zwei oder drei Seren im Betrieb positiv. Von insgesamt 36 Seren, die positiv auf Serovar hardjo reagierten, sind 29 (80,6 %) aus Betrieben, in denen zwei oder drei Seren positiv waren. Eine ständige Präsenz der Leptospiren durch Dauerausscheider im Umfeld eines Tieres kann auch die im Vergleich zu den anderen Serovaren hohen Serovar-hardjo-Titer erklären, da der mehrmalige Kontakt des Tieres zu sekundären Immunreaktionen (Boosterung) führen kann.

Sehr auffällig ist die regionale Konzentration der Reagenten mit Serovar hardjo auf ein bestimmtes Gebiet. Aus Karte 2 ist ersichtlich, dass die Mehrzahl der positiv getesteten Seren im Südwesten Bayerns (Allgäu) zu finden sind. Ebenfalls betroffen sind entlang der bayerischen Alpen die Landkreise Weilheim, Bad Tölz und Rosenheim. Die ermittelte Herdenprävalenz für alle Landkreise der Alpenregion mit vorgelagertem Grünlandgürtel liegt bei 5,86 %. Für das konzentrierte Auftreten der Hardjo-positiven Seren in diesem Bereich kommen als Ursache mehrere Faktoren in Frage, die eine Infektion begünstigen. Als wichtigster Faktor ist die Haltungsform der Tiere in den Betrieben zu nennen. Im Gegensatz zu der überwiegenden Stallhaltung im restlichen Bayern betreiben die Grünlandbetriebe im Allgäu und im weiteren bayerischen Alpenraum die Weidehaltung. Im Rahmen der Weidehaltung haben die Tiere mehrere Möglichkeiten, sich zu infizieren. Eine indirekte Infektion mit über den Harn ausgeschiedenen Leptospiren wird durch den zweiten wichtigen Faktor, dem erhöhten Niederschlag im Alpen- und Voralpengebiet, begünstigt.

Feuchtmilieu ist für Leptospiren eine Grundvoraussetzung, um außerhalb des Wirtsorganismus überleben zu können. Auch der direkte Weg der Übertragung wird durch Weidehaltung begünstigt. Insbesondere während der Brunst ist der typische Geruchkontakt am Genitalbereich und das Harnverkosten ungehindert möglich (FRENCH et al. 1989). Die in dieser Region geübte Praxis der Pensionsweidehaltung fördert zudem die Möglichkeit der Weiterverbreitung von Leptospiren zwischen den Herden der einzelnen Betriebe. Kommt es auf der Weide zu einer Infektion, ist nach der Rückkehr des Weiderindes in eine Leptospiren-naive Bestandsherde mit einer Durchseuchung zu rechnen. Ein Vergleich der Hardjopositiven Seren dieser Untersuchung mit der Angabe der Landwirte zur Frage „Abgabe von Tieren als Pensionsvieh“ (Sammelweiden, Alpen etc.) ergibt sich als höchst signifikant ($P \leq 0,01$).

In Nordirland, einer Region mit ebenfalls hohem Anteil an Weidehaltung und hohen Niederschlagswerten, stellte Ellis 1981 bei 34,7 % der Probanden ($n = 197$ Schlachtrinder, davon 155 Kalbinnen und Mastochsen) Serotyp-hardjo-spezifische ($MAR \geq 1:100$) Antikörper fest. Hier lag eine vom Alter der Tiere durchaus vergleichbare Stichprobe vor. Damit lag die Prävalenz in Nordirland erheblich höher als in der vorliegenden Studie (ELLIS et al. 1981). Brem untersuchte im Jahr 1984 im Rahmen der Leukoseüberwachung gewonnene Seren von 4860 Kühen aus ganz Bayern, die Häufigkeit der Seroreagenten lag bei 12,5 % (BREM u. SCHREYER 1988). Der Wert ist aufgrund der anderen Altersvorselektion der Probanden nicht direkt vergleichbar. Damit ist eine Aussage zur zeitlichen Veränderung der Prävalenz nicht machbar.

Die Angaben zu Erkrankungshäufigkeiten und zu Leistungsdaten (Milchmenge, Reproduktion) wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen Betrieben mit und ohne Seroreagenten gegen Leptospiren auf. Dies widerspricht möglicherweise nur scheinbar der klinischen Bedeutung der Infektion mit Leptospiren. Die punktuelle Erhebung der Seroprävalenz bei Jungtieren ist zwar für eine aktuelle Aussage zum Vorkommen von Leptospiren geeignet, die Dauerhaftigkeit einer enzootischen Infektion kann jedoch nicht beurteilt werden. Es könnte sich daher bei den seropositiven Betrieben um seit langem infizierte Herden handeln. In diesem Fall wäre mit einer hohen Inzidenz von Jungtierinfektionen bereits vor der ersten Gravidität zu rechnen. Tragende Rinder hätten dann bereits eine Immunität, die vor Infektionen mit der Folge von verringerter Milchleistung und Reproduktionsstörungen schützen würde. Schwere septikämische Erkrankungsfälle bei den Jungrindern sind für Serovar hardjo kaum zu erwarten, wie im Literaturteil bereits ausgeführt. Unter den 18 Sero-var-hardjo-positiven Herden ist möglicherweise keine einzige,

bei der die gefürchtete Neuinfektion im berichteten Zeitraum aufgetreten ist. Auch wäre denkbar, dass in einzelnen Fällen die Neuinfektion der Herde erst vor kurzem erfolgte, sodass klinische Auswirkungen noch nicht zu beobachten waren.

Untersuchungen mittels PCR zum direkten Nachweis von leptospirenspezifischer Nukleinsäure werden für verschiedene Gewebe beschrieben. Bekannt sind PCR-Untersuchungen aus Urin, Samen und Blut vom Rind (GERRITSEN et al. 1991; HEINEMANN et al. 1999; MASRI et al. 1997). Für den Nachweis von Leptospiren aus abortierten Rinderfeten verwendete Richtzenhain (2002) neben Labmageninhalt auch gepoolte Proben der Organe Lunge, Milz, Leber und Niere. Bei sieben Feten, die bei der Untersuchung des Labmageninhaltes Leptospiren-PCR-positiv waren und von denen gleichzeitig Organproben zur Verfügung standen, waren nur sechs Organproben-Pools mit positivem PCR-Befund. Die parallel durchgeführte kulturelle Isolierung war dagegen nur bei fünf Feten positiv (RICHTZENHAIN et al. 2002). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die molekularbiologischen Untersuchungen in dieser Studie nur aus Labmageninhalt durchgeführt.

Zur Feststellung der Sensitivität versetzte Richtzenhain (2002) Labmageninhalt eines abortierten Schaffetus mit Leptospiren und konnte dabei bis zu einer Verdünnung von 20 Bakterien/ml Leptospiren-DNS nachweisen. Bei der vorliegenden Arbeit wurde zur Evaluierung der verwendeten PCR eine Untersuchung mit Labmageninhalt eines Rinderfetuses mit vergleichbarem Ergebnis durchgeführt. Es war nicht Zielsetzung dieser epidemiologischen Studie, die Sensitivität einer PCR verglichen mit anderen Methoden zu prüfen. Daher wurde auf weiterführende Vergleichsuntersuchungen verzichtet. Der Nachweis von Leptospiren-spezifischer DNS gelang bei den 154 Proben in nur einem Fall. Dabei fiel auf, dass die Menge an DNS relativ gering war, entsprechend 60 Leptospiren pro Milliliter Labmageninhalt. Die Spezifität des Ergebnisses ist trotz des hohen C_t -Wertes nicht anzuzweifeln, da die Schmelzpunktbestimmung zu einem charakteristischen Ergebnis führte. Dagegen muss die Sensitivität der Methode insgesamt kritisch betrachtet werden. Weitere Entwicklungen, insbesondere im Bereich der Extraktionsmethoden für größere Ausgangsmengen, sind wünschenswert. Zur Bestimmung der tatsächlichen Menge Leptospiren-DNS in abortierten Feten liegen bisher keine quantitativen Untersuchungen vor. Hierzu wären Infektionsversuche sinnvoll. Auch bei den sieben Fällen von Richtzenhain kann keine quantitative Aussage bezüglich der DNS von Labmagen gemacht werden, da die PCR mit Gelelektrophorese ausgewertet wurde und somit nur ein Ja-nein-Ergebnis vorliegt.

Ein großer Vorteil der PCR gegenüber der kulturellen Isolierung ist die Möglichkeit, auch abgetötete Leptospiren nachweisen zu können. Dies ist von besonderer Bedeutung, da bei Untersuchungsmaterial aus abortierten Feten der Zustand häufig von Autolyse oder Heterolyse beeinträchtigt ist. Heterolyse tötet Leptospiren und macht diese unkultivierbar (ELLIS u. MICHNA 1976). Dies könnte auch der Grund für den gescheiterten Versuch der Isolierung aus dem PCR-positiven Labmageninhalt in der vorliegenden Studie und auch bei der Untersuchung von Richtzenhain sein. Ungünstig dürfte sich auch das zweimalige Einfrieren auf die Isolierung ausgewirkt haben. Aus logistischen Gründen und um einen Probenverderb zu vermeiden, wurden die Proben bei $< -20^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Stellt man die Prävalenz von 1,82 % der positiv untersuchten Seren der Prävalenz des Leptospiren-Nachweises in abortierten Rinderfeten mit 0,65 % gegenüber, so wird ersichtlich, dass beide Aussagen zur Leptospiroseprävalenz in Bayern im gleichen Bereich liegen. Einen direkten Vergleich lässt die unterschiedliche Methodik der Untersuchung und der Probenbeschaffung nicht zu. Während die Serumproben zufällig für ganz Bayern ausgewählt wurden, waren die abortierten Feten Anlassproben und häufig von Landwirten aus der Umgebung zum Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim oder Erlangen verbracht.

Die zur fetalen Diagnostik begleitenden serologischen Untersuchungen aus den betroffenen Beständen erbrachten bei zehn Tieren ein positives Ergebnis. Dabei konnten drei Seren Muttertieren zugeordnet werden, von denen ein Fetus mit negativem PCR-Ergebnis untersucht worden ist. Der fehlende Leptospirennachweis kann mehrere Ursachen haben. Zum einen könnten die Serumantikörper aus einer lang zurück liegenden Infektion stammen, die in keinem kausalen Zusammenhang mit dem Abort stand. Zum anderen könnten auch Inhibitoren in dem Probenmaterial oder eine zu geringe Sensitivität für das PCR-Ergebnis ursächlich gewesen sein.

Bei dem Fall des Fetus mit positivem PCR-Nachweis und wiederholt negativer Leptospiren-Serologie der Mutterkuh könnte eine chronische Infektion vorgelegen haben. Auch in der Literatur sind chronische Leptospireninfektionen für Serovar hardjo bei gleichzeitigem Fehlen von spezifischen Antikörpern beschrieben (ELLIS et al. 1982; HEATH u. JOHNSON 1994; MICHNA 1970). Trotz Aufforderung wurde kein geeignetes Material zur Diagnose einer chronischen Infektion zur Verfügung gestellt. Dagegen wurden bei einer weiteren Kuh, die aus derselben Laufstallherde stammt und ebenfalls verworfen hatte, Antikörper gegen Serovar hardjo nachgewiesen (Tabelle 12, Fall 4).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in Bayern Infektionen mit verschiedenen *Leptospira*-Serovaren nach wie vor vorkommen, jedoch mit geringer Häufigkeit. Die für Rinderherden relevante Hardjo-Infektion scheint nur in der Alpenregion und im Voralpenland aufzutreten. Im Mittel wurden dort in jeder 17. Herde Serovar-hardjo-spezifische Antikörper bei den Jungtieren gefunden (Konfidenzintervall 4,1 % bis 8,6 %).

Die Häufigkeit von *Leptospira*-PCR-positiven Proben abortierter Feten war sehr gering (1 Fetus von 154 untersuchten). Die Sensitivität der PCR wie auch der Erregerisolierung aus abortierten Feten ist letztlich nicht ausreichend bekannt. Eine methodische Weiterentwicklung für diese Fragestellung ist wünschenswert. Ein Hinweis für eine Relevanz der Serovar-hardjo-Infektionen beim Abortgeschehen konnte aus der Häufigkeit von Reagenten unter den Seren, die begleitend zu den Aborten eingesandt wurden, gewonnen werden. Hier waren bei 15 % der Betriebe (n = 47) Antikörper gegen Serovar hardjo nachweisbar. Derzeit muss für die ätiologische Abklärung von Aborten die zusätzliche serologische Untersuchung gegen Serovar hardjo von mindestens drei Kühen mit Abort bzw. von Nachbartieren empfohlen werden. Dies ist vor allem für Betriebe aus dem südbayerischen Raum zu empfehlen.

6 Zusammenfassung

Die Prävalenz von Antikörpern gegen Leptospiren wurde bei 3463 Seren aus 1213 zufällig gewählten bayerischen Milchvieh- und Mutterkuhherden bestimmt. Zirka drei Blutproben je Herde von Rindern im Alter von 6 Monaten bis ca. 2 Jahre wurden mittels MAR (mikroskopische Agglutinationsreaktion) gegen sechs Serovare untersucht. Die Prävalenz von Seren mit Titern von $\geq 1:100$ lag für die Serovare hardjo bei 1,04 %, canicola bei 0,09 %, grippotyphosa bei 0,75 %, icterohaemorrhagiae bei 0,26 %, pomona bei 0,00 % und für Serovar bratislava bei 0,14 %. Auf Herdenbasis wurde Serovar hardjo wegen des enzootischen Charakters der Hardjo-Infektion getrennt betrachtet. Basierend auf der Hypothese, dass drei seronegative Proben aus einer Herde eine enzootische Infektion nahezu ausschließen, wurde die Prävalenz von Hardjo-Verdachtsherden mit 1,48 % (18 von 1213 Herden) berechnet. Die 18 Betriebe wurden alle in Südbayern entlang der Alpen gefunden. In dieser Region liegt die Herdenprävalenz bei 5,86 % bei einem Konfidenzintervall von 4,10 %-8,56 % (Binomialverteilung, Vertrauensbereich 95 %). Für die übrigen Serovare war keine regionale Anhäufung zu erkennen. Bei 1,98 % der Herden (Konfidenzintervall 1,45 %-2,76 %) war mindestens eine der drei Proben seropositiv.

Zum Zeitpunkt der Blutentnahme wurden die Landwirte zu aktuellen und früheren klinischen Erkrankungen, Leistungsdaten (Milchertrag, Reproduktion) und epidemiologischen Daten befragt. In Herden mit Verdacht auf L.-Hardjo-Infektionen bzw. Infektionen mit anderen Serovaren im Vergleich zu Herden ohne Reagenten war kein signifikanter Unterschied bezüglich aktueller oder zurückliegender Anhäufung von klinischen Erkrankungen mit einem Verdacht auf Leptospirose gefunden worden. Auch war bei den Reproduktionsdaten und bei der Milchleistung kein signifikant negativer Effekt erkennbar. Bei den Herden mit Reagenten gegen Serovar hardjo wurde die Abgabe von Pensionsvieh höchst signifikant öfter praktiziert als bei den übrigen Herden ($p < 1,95^{-14}$, Fisher's Exact Test). Dieses Merkmal ist auch abhängig von der Region, da die Sammelweiden im Alpenbereich sehr weit verbreitet sind.

Abortfrüchte (N = 154), die von Hoftierärzten zur Diagnostik eingesandt wurden, wurden mittels *Leptospira*-spezifischer *Real-time*-PCR untersucht. Als Probe wurde Labmageninhalt verwendet. Bei einem Fetus konnte *Leptospira-interrogans*-spezifische DNS nachgewiesen werden. Die Anzucht der Leptospiren aus dem Labmageninhalt gelang nicht. Begleitende Seren von Kühen mit Fehlgeburt und Seren von anderen Rindern des Bestandes wurden aus 47 Betrieben zusätzlich zur Abortfrucht eingesandt. Bei 7 (15 %) Betrieben wurden Serovar-hardjo-spezifische Antikörper (MAR 1:200–1:3200) diagnostiziert.

7 Summary

Prevalence of *Leptospira* antibodies and of *Leptospira* in aborted fetuses in Bavarian cattle herds

The antibody prevalence to *Leptospira* was investigated in 3463 replacement cattle from 1213 randomly selected Bavarian dairy farms and mother cowherds. About three blood samples per herd of animals above 6 months of age were tested for *Leptospira* antibodies using micro-agglutination tests (MAT) with six serovars. The prevalence of animals with MAT-titers $\geq 1:100$ was against serovar hardjo 1,04%, canicola 0,09%, grippotyphosa 0,75%, icterohaemorrhagiae 0,26%, pomona 0,00% and bratislava 0,14%, respectively. On a herd level, the prevalence of L. Hardjo was considered separately due to the enzootic character of infections with this serovar in cattle. Setting the hypothesis that three negative sera out of replacement cattle would exclude enzootically infected hardjo-herds, a prevalence of herds suspected to harbour L. Hardjo infections of 1,48% (18 from 1213 herds) was found. The 18 herds were all in the region of southern Bavaria along the Alps. In this region the prevalence was calculated to be 5,86% with a confidence interval of 4,10% to 8,56% (binomial statistics; $\alpha=0,05$). The remaining serovars were with a spotted distribution over the country by a prevalence of 1,98% herds (confidence interval 1,45%-2,76%) containing at least one seropositive animal of the three tested.

At the time of blood collection, historical data were inquired for clinical diseases, herd performance (milk production, reproduction rates) and epidemiological data. In herds suspicious to have serovar hardjo infections or other serovars, respectively, compared to herds without there was no evidence for significant differences in the data about current or previous clinical diseases with respect to Leptospirosis. The herd performances were not reduced. A significant higher ratio of serovar hardjo positive herds was observed in farms using common pastures ($p < 1,95^{-14}$, Fisher's Exact Test). This criterion is additionally connected with the region of the Alps.

Miscarriaged fetuses ($N = 154$), which were sent to diagnostic laboratories from veterinarians, were investigated by a *Leptospira*-specific real time PCR using a specimen of abomasal content. One fetus was tested positive for *Leptospira interrogans* DNA. The following isolation attempt had a negative result. Sera from cows with abortion or neighbouring cattle were given from 47 herds of the above cases. In 7 (15%) of these serovar hardjo-specific antibodies (MAT 1:200–1:3200) could be found.

8 Literaturverzeichnis

- Adler, B., Cousins, D. V., Faine, S., u. Robertson, G. M. (1982)
Bovine IgM and IgG response to *Leptospira interrogans* serovar hardjo as measured by enzyme immunoassay.
Vet.Microbiol. 7, 577-585
- Bolin, C. A., Zuerner, R. L., u. Trueba, G. (1989)
Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis in bovine urine.
Am.J.Vet.Res. 50, 1001-1003
- Brem, S. (1984)
Leptospirose des Rindes.
Tierärztl.Umschau 39, 392-399
- Brem, S. (2003)
Auswahl der zu untersuchenden Serovare und Bestimmung der Ausgangsverdünnung.
Persönliche Mitteilung, 01.04.2003, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Dienststelle Oberschleißheim
- Brem, S. u. Schreyer, K. (1988)
[The occurrence of leptospiral antibodies in bovine sera from Bavaria].
Berl Munch.Tierärztl.Wochenschr. 101, 416-419
- Brendel, T. (2003)
Fragebogen für die Untersuchung der BVDV-Prävalenz in Bayern.
Persönliche Mitteilung, 15.05.2003, Dissertation, München, in Vorbereitung
- Brenner, D. J., Kaufmann, A. F., Sulzer, K. R., Steigerwalt, A. G., Rogers, F. C., u. Weyant, R. S. (1999)
Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies.
Int.J.Syst.Bacteriol. 49 Pt 2, 839-858
- Brown, P. D., Gravekamp, C., Carrington, D. G., van de Kemp, H., Hartskeerl, R. A., Edwards, C. N., Everard, C. O., Terpstra, W. J., u. Levett, P. N. (1995)
Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis.
J.Med.Microbiol. 43, 110-114
- Brown, P. D. u. Levett, P. N. (1997)
Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR.
J.Med.Microbiol. 46, 173-181
- Chernukha, Y. G., Shishkina, Z. S., Baryshev, P. M., u. Kokovin, I. L. (1976)
The dynamics of IgM- and IgG-antibodies in leptospiral infection in man.
Zentralbl.Bakteriol.[Orig.A] 236, 336-343
- Cole, J. R., Jr., Sulzer, C. R., u. Pursell, A. R. (1973)
Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test.
Appl.Microbiol. 25, 976-980

- Cumberland, P., Everard, C. O., u. Levett, P. N. (1999)
Assessment of the efficacy of an IgM-elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis.
Am.J.Trop.Med.Hyg. 61, 731-734
- Dura, E. U. (1993)
Vergleichende Untersuchungen von Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Mikroagglutinationsreaktion und Immunofluoreszenztest zum Nachweis von Antkörper gegen Leptospiren.
Dissertation, München
- Durfee, P. T. u. Allen, J. D. (1980)
Serological titres of dairy coys over a 63-week period following natural infection with *Leptospira interrogans* Serovar hardjo.
Aust.Vet.J. 56, 574-579
- Ellinghausen, H. C., Jr. u. McCullough, W. G. (1965)
Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: a serum-free medium employing oleic albumin complex.
Am.J.Vet.Res. 26, 39-44
- Ellinghausen, H. C. u. McCullough, W. G. (1967)
Albumin fatty acid broth for *Leptospira*, modified by Johnson and Harris.
J.Bacteriol. 94, 31
- Ellis, W. A. (1984)
The diagnosis of leptospirosis in farm animals. pp.13-24
In: Ellis, W.A., Little, T.W.A., eds. (1986): The present state of leptospirosis diagnosis and control., Dordrecht, Boston, Lancaster, Martinus Nijhoff Publishers
- Ellis, W. A. (1994)
Leptospirosis as a cause of reproductive failure.
Vet.Clin.North Am.Food Anim Pract. 10, 463-478
- Ellis, W. A. u. Michna, S. W. (1976)
Bovine leptospirosis: demonstration of leptospire of the Hebdomadis serogroup in aborted fetuses and a premature calf.
Vet.Rec. 99, 430-432
- Ellis, W. A. u. Michna, S. W. (1977)
Experimental leptospiral abortion in cattle.
Vet.Rec. 22, 255
- Ellis, W. A., Montgomery, J. M., u. Thiermann, A. B. (1991)
Restriction endonuclease analysis as a taxonomic tool in the study of pig isolates belonging to the Australis serogroup of *Leptospira interrogans*.
J.Clin.Microbiol. 29, 957-961
- Ellis, W. A., O'Brien, J. J., u. Cassells, J. (1981)
Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype hardjo infection in Northern Ireland.
Vet.Rec. 108, 555-557
- Ellis, W. A., O'Brien, J. J., Cassells, J. A., Neill, S. D., u. Hanna, J. (1985)
Excretion of *Leptospira interrogans* serovar hardjo following calving or abortion.
Res.Vet.Sci. 39, 296-298

- Ellis, W. A., O'Brien, J. J., Neill, S. D., u. Hanna, J. (1982)
Bovine leptospirosis: serological findings in aborting cows.
Vet.Rec. 110, 178-180
- Ellis, W. A., O'Brien, J. J., Pearson, J. K., u. Collins, D. S. (1976)
Bovine leptospirosis: infection by the Hebdomadis serogroup and mastitis.
Vet.Rec. 99, 368-370
- Ellis, W. A., Songer, J. G., Montgomery, J., u. Cassells, J. A. (1986)
Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar hardjo in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle.
Vet.Rec. 118, 11-13
- Faine, S. (1982)
Guidance for the control of leptospirosis.
Geneva, World Health Organization
(WHO Offset Publication No. 67).
- Faine, S. (1994)
Leptospira and Leptospirosis.
Boca Raton, Florida, CRC Press
- French, J. M., Moore, G. F., u. Perry, G. C. (1989)
Behavioural predictors of oestrus in domestic cattle, *Bos taurus*.
Animal Behavior 38, 913
- Gerritsen, M. J., Olyhoek, T., Smits, M. A., u. Bokhout, B. A. (1991)
Sample preparation method for polymerase chain reaction-based semiquantitative detection of *Leptospira interrogans* serovar hardjo subtype hardjobovis in bovine urine.
J.Clin.Microbiol. 29, 2805-2808
- Goddard, R. D., Luff, P. R., u. Thornton, D. H. (1991)
The serological response of calves to *Leptospira interrogans* serovar hardjo vaccines and infection as measured by the microscopic agglutination test and anti-IgM and anti-IgG enzyme-linked immunosorbent assay.
Vet.Microbiol. 26, 191-201
- Gravekamp, C., van de Kemp, H., Franzen, M., Carrington, D., Schoone, G. J., Van Eys, G. J., Everard, C. O., Hartskeerl, R. A., u. Terpstra, W. J. (1993)
Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers.
J.Gen.Microbiol. 139 (Pt 8), 1691-1700
- Hanson, L. E. (1982)
Leptospirosis in domestic animals: the public health perspective.
J.Am.Vet.Med.Assoc. 181, 1505-1509
- Hathaway, S. C. u. Little, T. W. (1983)
Epidemiological study of *Leptospira hardjo* infection in second calf dairy cows.
Vet.Rec. 112, 215-218
- Hathaway, S. C., Little, T. W., u. Pritchard, D. G. (1986)
Problems associated with the serological diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in bovine populations.
Vet.Rec. 119, 84-86

- Heath, S. E. u. Johnson, R. (1994)
Leptospirosis.
J.Am.Vet.Med.Assoc. 205, 1518-1523
- Heinemann, M. B., Garcia, J. F., Nunes, C. M., Morais, Z. M., Gregori, F., Cortez, A., Vasconcellos, S. A., Visintin, J. A., u. Richtzenhain, L. J. (1999)
Detection of leptospire in bovine semen by polymerase chain reaction.
Aust.Vet.J. 77, 32-34
- Herrmann, J. L., Bellenger, E., Perolat, P., Baranton, G., u. Saint Giron, I. (1992)
Pulsed-field gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification.
J.Clin.Microbiol. 30, 1696-1702
- Hodges, R. T. u. Ris, D. R. (1974)
Complement fixing and agglutinating antibody responses and Leptospirosis in calves inoculated with leptospira serotypes pomona, hardjo, copenhageni or ballum.
N.Z.Vet.J. 22, 25-30
- Hookey, J. V. (1992)
Detection of Leptospiraceae by amplification of 16S ribosomal DNA.
FEMS Microbiol.Lett. 69, 267-274
- Katze, J. u. Mochmann, H. (1967)
Leptospiren und Leptospirosen.
Jena, G. Fischer
- Kee, S. H., Kim, I. S., Choi, M. S., u. Chang, W. H. (1994)
Detection of leptospiral DNA by PCR.
J.Clin.Microbiol. 32, 1035-1039
- Kmety, E. (1958)
[Paradox reactions and their significance in serodiagnosis of some types of leptospirosis.].
Zentralbl.Bakteriol.[Orig.] 170, 597-608
- Kreienbrock, L. u. Schach, S. (2000)
Statistische Grundlagen der Epidemiologie. S. 132-134
In: Epidemiologische Methoden., Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag
- Kuiken, T., van Dijk, J. E., Terpstra, W. J., u. Bokhout, B. A. (1991)
The role of the common vole (*Microtus arvalis*) in the epidemiology of bovine infection with *Leptospira interrogans* serovar hardjo.
Vet.Microbiol. 28, 353-361
- Levett, P. N. (2001)
Leptospirosis.
Clin.Microbiol.Rev. 14, 296-326
- Little, T. W. (1986)
Changes in our understanding of the epidemiology of leptospirosis. pp. 149-173
In: Ellis, W.A., Little, T.W.A., eds. (1986): The present state of leptospirosis diagnosis and control., Dordrecht, Boston, Lancaster, Martinus Nijhoff Publishers

- Lupidi, R., Cinco, M., Balanzin, D., Delprete, E., u. Varaldo, P. E. (1991)
Serological follow-up of patients involved in a localized outbreak of leptospirosis.
J.Clin.Microbiol. 29, 805-809
- Masri, S. A., Nguyen, P. T., Gale, S. P., Howard, C. J., u. Jung, S. C. (1997)
A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* spp. in bovine semen.
Can.J.Vet.Res. 61, 15-20
- Merien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., u. Saint Girons, I. (1992)
Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples.
J.Clin.Microbiol. 30, 2219-2224
- Merien, F., Baranton, G., u. Perolat, P. (1995)
Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis.
J.Infect.Dis. 172, 281-285
- Michna, S. W. (1970)
Leptospirosis.
Vet.Rec. 86, 484-496
- Myers, D. M. (1976)
Effect of culture medium on the agglutinability of leptospires by the microscopic agglutination test.
Rev.Argent Microbiol. 8, 14-20
- Oliveira, M. A., Caballero, O. L., Dias Neto, E., Koury, M. C., Romanha, A. J., Carvalho, J., Hartskeerl, R. A., u. Simpson, A. J. (1995)
Use of nondenaturing silver-stained polyacrylamide gel analysis of polymerase chain reaction amplification products for the differential diagnosis of *Leptospira interrogans* infection.
Diagn.Microbiol.Infect.Dis. 22, 343-348
- Palit, A., Middleton, H., Sheers, J., u. Basilone, C. (1991)
The influence of maternal antibody and age of calves on effective vaccination against *Leptospira interrogans* serovar hardjo.
Aust.Vet.J. 68, 299-303
- Perolat, P., Merien, F., Ellis, W. A., u. Baranton, G. (1994)
Characterization of *Leptospira* isolates from serovar hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site polymorphisms.
J.Clin.Microbiol. 32, 1949-1957
- Prescott, J. F. (1992)
Leptospirosis. pp. 503-510
In: Jubb, K. V. F., Kennedy, P.C., Palmer, N. C.: Pathology of domestic animals. 4th ed., London, Academic Press
- Ramadass, P., Jarvis, B. D., Corner, R. J., Cinco, M., u. Marshall, R. B. (1990)
DNA relatedness among strains of *Leptospira biflexa*.
Int.J.Syst.Bacteriol. 40, 231-235

- Ramadass, P., Jarvis, B. D., Corner, R. J., Penny, D., u. Marshall, R. B. (1992)
Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization.
Int.J.Syst.Bacteriol. 42, 215-219
- Reischl, U. (2003)
Methoden zur Extraktion von Leptospiren-DNA aus klinischem Probenmaterial.
Persönliche Mitteilung, 01.04.2003, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der
Universität Regensburg
- Richtzenhain, L. J., Cortez, A., Heinemann, M. B., Soares, R. M., Sakamoto, S. M.,
Vasconcellos, S. A., Higa, Z. M., Scarcelli, E., u. Genovez, M. E. (2002)
A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted
bovine fetuses.
Vet.Microbiol. 87, 139-147
- Rolle, M. u. Mayr, A. (2002)
Bakterielle Krankheiten der Tiere. S. 423-427
In: Medizinische Mikrobiologie, Infektionslehre und Seuchenlehre., 7. Auflage,
Stuttgart, Enke Verlag
- Savio, M. L., Rossi, C., Fusi, P., Tagliabue, S., u. Pacciarini, M. L. (1994)
Detection and identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with
restriction endonuclease analysis of amplified DNA.
J.Clin.Microbiol. 32, 935-941
- Schönberg, A. (1984)
Diagnostik bei Leptospiren.
Zbl.Bakt.Hyg. A 258, 480-491
- Selbitz, H.-J. (1992)
Spirochaetales. S. 33-40
In: Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie.
Jena, Fischer Verlag
- Smith, D. J. u. Self, H. R. (1955)
Observations on the survival of *Leptospira australis* A in soil and water.
J.Hyg.(Lond) 53, 436-444
- Surujballi, O. u. Mallory, M. (2001)
Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Leptospira interrogans*
serovar pomona antibodies in bovine sera.
Clin.Diagn.Lab Immunol. 8, 40-43
- Taxonomy Browser (2004)
www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=171 .
Internet, 01.05.2004
- Terpstra, W. (2003)
Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control.
World Health Organisation
- Terpstra, W. J., Ligthart, G. S., u. Schoone, G. J. (1980)
Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA).
Zentralbl.Bakteriol.A 247, 400-405

- Thiermann, A. B. (1982)
Experimental leptospiral infections in pregnant cattle with organisms of the Hebdomadis serogroup.
Am.J.Vet.Res. 43, 780-784
- Thiermann, A. B. (1984)
Leptospirosis: current developments and trends.
J.Am.Vet.Med.Assoc. 184, 722-725
- Thiermann, A. B. u. Garrett, L. A. (1983)
Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovars hardjo and pomona in cattle.
Am.J.Vet.Res. 44, 884-887
- Turner, L. H. (1967)
Leptospirosis. I.
Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 61, 842-855
- Turner, L. H. (1968)
Leptospirosis. II. Serology.
Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 62, 880-899
- Turner, L. H. (1970)
Leptospirosis. 3. Maintenance, isolation and demonstration of leptospire.
Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 64, 623-646
- Wagenaar, J., Zuerner, R. L., Alt, D., u. Bolin, C. A. (2000)
Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in urine of cattle.
Am.J.Vet.Res. 61, 316-320
- Wagenaar, J. A., Segers, R. P., u. Van der Zeijst, B. A. (1994)
Rapid and specific detection of pathogenic *Leptospira* species by amplification of ribosomal sequences.
Mol.Biotechnol. 2, 1-14
- Weber, A., Weber, G., u. Krauss, H. (1984)
Evaluation of the slide agglutination test for detection of leptospiral antibodies in serum samples of slaughter pigs.
Zentralbl.Bakteriol.Mikrobiol.Hyg.[A] 257, 498-500
- Wojtek, H. (1966)
Zur Leptospirose der Haus- und Versuchstiere.
Tierärztl.Umschau 9, 449
- Woo, T. H., Smythe, L. D., Symonds, M. L., Norris, M. A., Dohnt, M. F., u. Patel, B. K. (1997)
Rapid distinction between *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* by PCR amplification of 23S ribosomal DNA.
FEMS Microbiol.Lett. 150, 9-18
- Woodward, M. J., Sullivan, G. J., Palmer, N. M., Woolley, J. C., u. Redstone, J. S. (1991)
Development of a PCR test specific for *Leptospira hardjo* genotype bovis.
Vet.Rec. 128, 282-283

Woodward, M. J., Swallow, C., Kitching, A., Dalley, C., u. Sayers, A. R. (1997)
Leptospira hardjo serodiagnosis: a comparison of MAT, ELISA and Immunocomb.
Vet.Rec. 141, 603-604

Yelton, D (2004)
www.hsc.wvu.edu/micro/faculty/yelton.htm.
Internet, 27.05.2004

Zuerner, R. L., Alt, D., u. Bolin, C. A. (1995)
IS1533-based PCR assay for identification of Leptospira interrogans sensu lato serovars.
J.Clin.Microbiol. 33, 3284-3289

Danksagung

An der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. O.-R. Kaaden für Überlassung des Themas, Beratung sowie für die Vertretung der Arbeit vor dem Fachbereich.

Für die sachkundige Anleitung und gewährte Unterstützung in allen Bereichen möchte ich ganz besonders Herrn Dr. Wolf danken. Ohne seine kritische Diskussionsbereitschaft und seine fundamentierten Ratschläge wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Frau Dr. C. Werckenthin danke ich für die Beratung in molekularbiologischen Fragen und die Überlassung eines Arbeitsplatzes in ihrem Labor. Frau H. Hubert danke ich für die freundliche Hilfe bei der Einarbeitung im Labor und ihre Unterstützung.

Hilfe bei der statistischen Auswertung der Fragebögen und weitere Beratung wurde mir mit der freundlichen Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Osterkorn gewährt.

Am Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim und Erlangen:

Die Erlaubnis für das Anfertigen der praktischen Tätigkeit im Bereich der Serologie und die Bereitstellung der dafür nötigen Materialien gestatteten mir Herr Dr. Barth, Herr Dr. Gerbermann und Herr Dr. Schmidt. Herzlichen Dank für die Unterstützung im jeweiligen Bereich.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Dr. P. Meyer und Herrn Dr. H. Kopp verpflichtet. Die freundliche Aufnahme in ihrem Labor, die Bereitstellung von Material und Technik sowie die fachliche Unterweisung waren essenziell für meine Arbeiten. Besonderen Dank auch an Frau Maria Hauser, stellvertretend für das gesamte technische Personal, für ihr vielfältiges und freundliches Entgegenkommen.

Den an der Probenmaterialbereitstellung beteiligten Tierärzten aus der Pathologie, Herrn Dr. Schrott, Herrn Dr. Ebert, Herrn Dr. Milke und Herrn Dr. Müller, sowie deren Helfern ein herzliches Dankeschön.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Dr. Brem, Herrn Dr. Hellwig, Frau Dr. Forster und Herrn Dr. Birlbauer für die Beratung in fachlichen Fragen bedanken.

Die allgegenwärtigen Probleme in Fragen zur EDV half mir Herr Zenk bereitwillig zu meistern.

Am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg:

Der großzügigen Unterstützung aus meiner Heimatstadt Regensburg bin ich besonders verpflichtet. Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. N. Lehn wurden mir Methodik, Material und personelle Unterstützung zur Verfügung gestellt. Herrn Dr. U. Reischl oblag die fachliche Unterweisung und Herrn M. Bollwein die umfassende Hilfe bei der Ausführung. Allen herzlichen Dank.

Lebenslauf

Am 03.03.1975 wurde ich als Sohn von Alfons und Maria Schmid, geb. Streidl, in Regensburg geboren.

Nach 4 Jahren an der Grundschule Prüfening wechselte ich 1985 an das Gymnasium und verbrachte meine weitere Schulzeit am Maristen-Gymnasium in Furth sowie am Goethe-Gymnasium in Regensburg und bestand dort 1996 das Abitur.

Von 1996 bis 1997 leistete ich meinen Wehrdienst bei der Bundesluftwaffe ab.

Im Wintersemester 1997 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und beendete mein Studium am 24.02.2003 mit dem Staatsexamen.

Von 01.04.2003 an beschäftige ich mich mit der vorliegenden Arbeit.

Seit 01.03.2004 bin ich als Angestellter am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Erlangen beschäftigt.